



Régulation de la survie des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans un contexte inflammatoire non viral

Adrien Mossu

► To cite this version:

Adrien Mossu. Régulation de la survie des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans un contexte inflammatoire non viral. Immunothérapie. Université de Franche-Comté, 2015. Français. NNT : 2015BESA3011 . tel-01374483

HAL Id: tel-01374483

<https://theses.hal.science/tel-01374483>

Submitted on 30 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

" Université de Franche-Comté – UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques "

École doctorale Environnements – Santé

Régulation de la survie des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans un contexte inflammatoire non viral

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 28 octobre 2015 par

Adrien MOSSU

En vue du grade de **Docteur de l'Université de Franche-Comté**

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Directeur de thèse : Dr Sylvain PERRUCHE

Jury :

Pr. Lucienne CHATENOU
Institut Necker-Enfants Malades

Rapporteur

Pr. Stéphanie HUGUES
Université de Genève

Rapporteur

Pr. Bernard BONNOTTE
Université de Bourgogne

Examineur

Dr. Sylvaine YOU
Institut Necker-Enfants Malades

Examineur

Je souhaite en premier lieu remercier les Pr Lucienne Chatenoud et Pr Stéphanie Hugues pour avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse, et de venir discuter de ces résultats en participant au jury lors de la soutenance. Je remercie également le Dr Sylvaine You pour sa participation au jury, mais aussi pour son avis et ses conseils tout au long de ce projet au sein du comité de suivi de thèse. Je remercie aussi le Pr Bernard Bonnotte qui a accepté de venir participer à mon jury de thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr Sylvain Perruche pour son encadrement pendant ces quatre années. Je lui suis reconnaissant de m'avoir apporté son expertise, son aide, son dynamisme, ses encouragements ainsi que son amitié, qui ont tous été des moteurs précieux pour moi.

Je remercie aussi le Pr Philippe Saas pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche, pour ses conseils toujours avisés et pour son amitié.

Je remercie l'INSERM et la région Franche-Comté pour leur soutien financier durant mes trois années de thèse.

Je remercie également toutes les personnes à l'UMR1098 qui ont été nécessaires à l'aboutissement de ce travail, mes collègues et mes amis :

Anna pour sa bonne humeur et son aide précieuse pendant toutes ces expériences, même s'il a parfois fallu aller jusqu'à me tirer directement du lit pour ça ! J'espère qu'une de tes nombreuses idées finira par aboutir à l'invention de tes rêves.

Romain qui m'a accompagné pendant une grande partie de mon séjour au laboratoire, et avec qui je n'ai passé que des bons moments. Tes grommèlements manquent quand même un peu à l'ambiance sonore de l'IBCT.

Mélanie pour son immense gentillesse et sa disponibilité, et aussi pour avoir corrigé mon manuscrit. Travailler avec toi a toujours été agréable, mais maintenant que je pars il va malheureusement falloir que tu trouves un nouveau chouchou !

Francis dont les nombreux conseils m'ont été d'un grand secours au laboratoire et pour toutes ces fois où on s'est quand même bien marré. J'espère pouvoir retrouver un compagnon de bricolage aussi talentueux.

Omy et Thierry qui m'ont enfin permis après trois ans de ne plus être le petit nouveau. Votre arrivée au labo a vraiment fait souffler un vent de fraîcheur bienvenue dans l'équipe. Thierry, travaille ton shoot il n'est pas encore tout à fait au point, je vais finir par te mettre la raclée ! Mais fais attention à ne pas trop embêter Omy qui est sérieuse... Mais pas trop quand même ! Vous avez été des compagnons de bureau fort attachants et je vous souhaite bon courage pour finir votre thèse.

Mymi que je ne crois pas avoir vu de mauvaise humeur plus d'une minute d'affilée. Merci pour ta bonne humeur et ton aide avec tout le micmac administratif, et aussi pour la correction de mon manuscrit.

Lucie pour avoir été une stagiaire brillante et attentive m'ayant bien aidé dans mes expériences.

Sophie, Jessy, Sandra et Claire pour toutes les franches rigolades que j'ai pu avoir avec vous. Vos éclats de rires ont rendu bien des journées plus agréables.

Dom, François, Baptiste, Emilie et Pacou pour avoir partagé quotidiennement de bons moments avec moi à l'IBCT.

À toutes les personnes travaillant à l'EFS que j'ai moins souvent vu, mais qui ont pu me fournir leur aide, leur gentillesse et leur amitié (Adam, Clémence, Jeanne, Sarah, Anne, Sabeha, Jean-René, Clémentine, Laurent, Jean-Marie, Jérémie, Idir, Patricia, Jean-Paul, Kiki, Yann, Olivier)

Je tiens également à remercier chaleureusement ma famille et mes amis extérieurs au laboratoire. Leur soutien a été absolument nécessaire pour que toutes ces années d'études menant à cette thèse soit un plaisir, en plus d'être une réussite.

Enfin je remercie Noémie pour son soutien permanent, pour être mon amie, et mon amour.

LISTE DES ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION.....	6
I- Réponse immunitaire et interface entre l'immunité innée et adaptative	7
1. L'immunité innée	7
1.1 Activation des réponses immunes par les signaux dangers	7
1.1.1 Les signaux de danger et leur reconnaissance.....	7
1.1.2 Régulation des réponses inflammatoires par la compartimentation des PRRs.....	10
1.1.3 Les ligands de PRRs dans la modulation des réponses innées	11
1.2 Les effecteurs de l'immunité innée.....	12
1.2.1 Les phagocytes : neutrophiles et macrophages	12
1.2.2 Les cellules natural killer et leurs mécanismes cytotoxiques effecteurs	15
2. Les cellules dendritiques à l'interface avec l'immunité adaptative	19
2.1 Caractéristiques des cellules dendritiques	19
2.2 Les différentes sous populations de cellules dendritiques	20
2.3 Polarisation des LT par les cellules dendritiques conventionnelles lors de la réponse inflammatoire	21
2.3.1 La polarisation de type Th1.....	21
2.3.2 La polarisation de type Th2.....	22
2.3.3 La polarisation de type Th17.....	22
2.3.4 La polarisation des LT CD8 ⁺ cytotoxiques	23
2.4 Polarisation et mécanismes d'action des Treg dans le maintien de la tolérance	25
II- Rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans la réponse inflammatoire	28
1. Phénotype des cellules dendritiques plasmacytoïdes murines	28
2. Fonctions des pDC dans l'immunité innée.....	29
2.1 Voies de signalisation des TLR7 et TLR9 dans les pDC.....	29
2.2 Fonctions des IFN de type I.....	30
2.2.1 Voies de signalisation d'IFNAR	31
2.2.2 Action antivirale directe des IFN-I.....	31
2.2.3 Action de l'IFN- α/β sur les cellules immunitaires	32
3. Fonctions des pDC dans l'immunité adaptative	32

3.1	Capacité de présentation de l'antigène des pDC	33
3.2	Orientation de la réponse LT par les pDC	34
3.2.1	Polarisation des LT CD4 ⁺ naïfs par les pDC.....	34
3.2.2	Activation des LT CD8 ⁺ par les pDC.....	35
4.	Implication des pDC dans les pathologies auto-immunes	36
4.1	Les pDC dans le lupus érythémateux disséminé (SLE)	36
4.2	Les pDC dans le psoriasis.....	37
4.3	Les pDC dans la sclérose en plaques (SEP)	38
4.4	Les pDC dans le diabète de type I	39
III-	Mécanismes de contrôle de la réponse inflammatoire	41
1.	Régulation de la survie des cDC lors de la réponse inflammatoire	42
1.1	L'apoptose des cDC dans la régulation de l'inflammation.....	42
1.2	Mécanismes pro-apoptotiques des cDC.....	43
2.	Efferocytose et tolérance	45
2.1	Effets immuno-modulateurs des cellules apoptotiques	46
2.2	Induction des LT régulateurs par les phagocytes.....	48
2.3	Propriétés de l'anticorps anti-CD3	48
2.3.1	Caractéristiques du syndrome pseudo-grippal	49
2.3.2	Les causes de l'orage cytokinique.....	49
2.3.3	Propriétés tolérogènes de l'Ac αCD3	50
3.	Les pDC dans l'induction de tolérance	52
IV-	Objectifs des travaux de thèse	54
	RESULTATS.....	55
I-	Régulation de la survie des cellules dendritiques plasmacytoïdes par la voie de la perforine des LT CD8⁺ au cours d'une inflammation aigüe	56
II-	Résultats complémentaires.....	87
	Matériel et méthodes.....	87
	Résultats.....	89

DISCUSSION	101
1. L'activation des LT induit la perte des pDC	103
2. Rôle des cytokines inflammatoires dans la régulation de la survie des pDC	106
3. L'activation des LT induit l'apoptose des pDC par la voie de la perforine.....	110
4. Relevance du mécanisme de régulation de la survie des pDC dans le cadre de pathologies inflammatoires.....	112
REFERENCES.....	116

Liste des abréviations

A

Ac : Anticorps

Ac α CD3 : Anticorps anti-CD3

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ANA : Auto-anticorps Anti-Nucléaires

AP-1 : Protéine Activatrice 1

B

BDCA : Blood Dendritic Cell Antigen

BST-2 : Bone-marrow Stroma cell antigen-2

C

CCLx : C-C Chemokine Ligand type x

CCRx : C-C Chemokine Receptor type x

CD : Cluster de Différenciation

cDC : Cellule Dendritique Conventiionelle

CLRs : Récepteurs à Lectine de type C

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène

CpG ODN : CpG Oligodéoxynucléotide

CsA : Ciclosporine A

CTL : Lymphocyte T Cytotoxique

D

DAMPs : Motifs Moléculaires Associés au Dommages Cellulaires

DC : Cellule Dendritique

DST : Donor-Specific Transfusion

E

EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale

F

FADD : Fas Associated Death Domain (= protéine Fas associée à un domaine de mort)

FasL : Ligand de Fas

Fc γ -R : Récepteurs de la partie Fc des IgG

FoxP3 : Forkhead Box P3

G

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor (= Facteur de stimulation des colonies de granulocytes)

GFP : Green Fluorescent Protein (= Protéine fluorecente verte)

GG : Ganglions périphériques

gld : Generalized Lymphoproliferative Disease

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (= Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et macrophages)

GvHD : Graft *versus* Host Disease

H

HBV : Virus de l'Hépatite B

HCV : Virus de l'Hépatite C

HLH : Hémophagocytose Lymphohistiocytaire

HMGB1 : High Mobility Group Box 1

HSPs : Protéines de Choc Thermique

HSV : Virus Herpès Simplex

I

ICOS : Inducible T-cell COStimulator

ICOSL : Inducible T-cell COStimulator Ligand

IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase

IFNAR : Récepteur aux Interférons de type I

IFN-x : Interféron x

IFN-I : Interféron de type I

IgG : Immunoglobuline G

IL-x : Interleukine x

i.p. : Intrapéritonéal

IPC : Cellules Productrices d'Interféron de type I

ISG : Interferon Stimulated Gene (= Gènes stimulés par les interférons)

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif

iTreg : Lymphocyte T régulateur induit

i.v. : Intraveineux

J

JAKs : Kinases de la famille Janus

L

LB : Lymphocyte B

LC : Cellules de Langerhans

LCMV : Virus de la Chorioméningite Lymphocytaire

LCS : Liquide Cérébrospinal

lpr : Lymphoprolifération

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocyte T

M

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MCMV : Cytomégalo­virus Murin

MO : Moelle Osseuse

mPDCA : Mouse Plasmacytoid Dendritic Cell Antigen
(= Antigène des cellules dendritiques plasmacytoïdes murines)

MTOC : Centre d'Organisation des Microtubules

MyD88 : Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88

N

NETs : Neutrophil Extracellular Traps

NF-κB : Nuclear Factor-kappa B

NK : Natural Killer

NLRs : Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) Receptors (= Récepteur de type NOD)

NOD : Non Obese Diabetes

nTreg : Lymphocyte T régulateur naturel

O

OAS : 2'-5' Oligoadénylate Synthétases

P

PAMPs : Motifs Moléculaires Associés au Pathogènes

pDC : Cellule Dendritique Plasmacytoïde

PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase

PKC : Protéine Kinase C

PKR : Protéine Kinase R

PolyI:C : Polyinosinique-Polycytidylique

PRRs : Récepteurs de Reconnaissance de Motifs Moléculaires

R

RLRs : Récepteurs Cytoplasmiques de type RIG-I

ROR-γt : RAR-related Orphan Receptor gamma t

ROS : Dérivés Réactifs de l'Oxygène

S

Siglec : Sialic acid-binding immunoglobulin like lectin

SLE : Lupus Erythémateux Disséminé

SNC : Système Nerveux Central

SEP : Sclérose en Plaques

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

T

T1D : Diabète de type I

TBX21 : T-box transcription factor TBX21

TCR : Récepteur des Lymphocytes T

TGF-β : Transforming Growth Factor Beta

Thx : Lymphocyte T helper x (= Lymphocyte T effecteur)

TLR : Récepteur de type Toll

TNF : Facteur de Nécrose Tumorale

TNFR : Récepteur au TNF

TRADD : Domaine de Mort associé au TNFR1

TRAIL : TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand

TRAILR : TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor

TSLP : Thymic Stromal Lymphopoietin (= Lymphopoïétine Stromale Thymique)

Treg : Lymphocyte T régulateur

V

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VV : Virus de la Vaccine

W

WT : Wild Type (= sauvage)

Introduction

I- Réponse immunitaire et interface entre l'immunité innée et adaptative

La réponse immunitaire est classiquement définie par deux composantes distinctes, l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée va être en première ligne pour lutter contre les agressions par des organismes pathogènes comme les virus et les bactéries. L'immunité adaptative viendra par la suite apporter une réponse plus spécifique, et une mémoire contre ces infections par des microorganismes ou pour reconnaître des cellules endommagées. Bien que ces deux phases soient distinctes et composées de leurs effecteurs propres, l'une ne fonctionne pas sans l'autre. D'une part l'immunité innée va permettre d'initier les réponses adaptatives par l'intermédiaire de signaux cellulaires et moléculaires, et d'autre part, une fois activée, l'immunité adaptative va utiliser des mécanismes de l'immunité innée pour lutter contre les infections. Les différents mécanismes de ces deux voies seront donc décrits dans deux parties distinctes et une attention particulière sera portée à certaines cellules faisant l'interface entre ces deux types de réponses, les cellules dendritiques (DC).

1. L'immunité innée

La réponse aux agressions de l'organisme soit par des microorganismes pathogènes, soit par des cellules endommagées, va conduire à une cascade de réponses du système immunitaire qui vont successivement se mettre en place jusqu'au contrôle et à l'élimination de l'agresseur. Chez les mammifères, la première ligne de défense contre les infections reste les épithéliums comme la peau, qui va fournir une barrière physique pour protéger contre les microorganismes extérieurs, ou encore comme l'épithélium intestinal qui empêche la dissémination de la flore commensale au sein de l'organisme. Cependant quand ces premières lignes de défenses sont brisées ou que l'organisme doit gérer un stress cellulaire interne, le système immunitaire va gérer le conflit grâce à la réponse immunitaire innée. Si les effecteurs de l'immunité innée ne sont pas capables de reconnaître de façon spécifique des pathogènes, contrairement aux effecteurs de la réponse adaptative, ils sont cependant en mesure de discriminer les cellules du soi des pathogènes, les cellules saines des cellules endommagées. Cette reconnaissance se fait grâce à une série des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs), capables de détecter tout un panel de molécules produites lors du stress cellulaire, appelées signaux de dangers.

1.1 Activation des réponses immunes par les signaux dangers

1.1.1 Les signaux de danger et leur reconnaissance

Les microorganismes pathogènes tout comme les cellules endommagées vont produire des molécules reconnues comme des signaux de danger par l'organisme. Ces structures sont appelées motifs moléculaires associés au pathogènes (PAMPs) (Janeway, 1989; Janeway and Medzhitov, 2002). Cependant, il existe aussi d'autres structures moléculaires capables d'agir comme des signaux de danger permettant d'activer le système immunitaire, mais cette fois d'origine endogène, ce sont les motifs moléculaires associés aux dommages cellulaires (DAMPs), ou alarmines. Les DAMPs sont produits par les

cellules endommagées suite à un stress cellulaire (Bianchi, 2007). Ces différents motifs moléculaires vont être reconnus par les PRRs et permettre aux cellules effectrices de l'immunité innée de s'activer.

Les récepteurs de type Toll (TLR) sont les PRRs les plus décrits, et ce sont eux qui vont être responsables de la reconnaissance des PAMPs (Akira, 2003). Chez la souris, douze TLR ont été identifiés à ce jour (Akira *et al.*, 2006), dont les principaux sont les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6 qui ont une localisation membranaire en surface des cellules, et les TLR3, TLR7 et TLR9 surtout présents à la membrane du réticulum endoplasmique (Barton and Kagan, 2009). Tous ces TLR vont être capables de reconnaître un grand nombre de PAMPs apportés par les pathogènes (figure 1). Le TLR2 est capable de former des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6 (Ozinsky *et al.*, 2000), afin de reconnaître une large gamme de ligands comprenant des lipoprotéines produites par les bactéries et les virus entre autres, et le peptidoglycane produit par les bactéries à Gram positif. Les complexes TLR2/TLR1 et TLR2/TLR6 vont être capables de reconnaître respectivement les lipoprotéines triacylés et diacylés (Takeuchi and Akira, 2010; Takeuchi *et al.*, 2001; Takeuchi *et al.*, 2002). Le TLR4 reconnaît un composant majeur des bactéries à Gram négatif, le lipopolysaccharide (LPS) (Hoshino *et al.*, 1999). Cependant le TLR4 a besoin de la protéine MD-2 pour lier de façon efficace le LPS, et permettre au complexe TLR4/MD-2 de transduire un signal d'activation *via* NF- κ B (Shimazu *et al.*, 1999). Enfin, le TLR5 surtout exprimé par les DC intestinales, reconnaît la flagelline, issue des bactéries possédant un flagelle (Hayashi *et al.*, 2001). Les TLR3, TLR7 et TLR9 sont eux spécialisés dans la reconnaissance des acides nucléiques, notamment bactériens et viraux. Le TLR3 va lier les ARN double brin dont l'analogue synthétique est l'acide polyinosinique-polycytidylique (polyI:C) (Alexopoulou *et al.*, 2001), tandis que le TLR7 a pour ligand les ARN simple brin (Diebold *et al.*, 2004; Hemmi *et al.*, 2002). Le TLR9, quant à lui, va reconnaître les ADN non méthylés contenant des motifs CpG largement présents au sein des ADN viraux, comme ceux des virus herpès simplex (HSV) et du cytomégalo virus murin (MCMV) (Krug *et al.*, 2004a; Krug *et al.*, 2004b; Lund *et al.*, 2003). L'engagement de ces voies TLR, à part celle du TLR3, par leurs ligands va permettre d'initier une cascade de signalisation cellulaire passant par la protéine adaptatrice MyD88 (Kawai and Akira, 2006). Cette activation des TLR par les PAMP va conduire à la production par les cellules de cytokines pro-inflammatoires dans le cas des TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6, et à la production plus spécifique d'interféron de type I (IFN-I) pour les TLR3, TLR7 et TLR9 (figure 1). Cependant le TLR4 est également capable de provoquer une sécrétion d'IFN-I en induisant la voie de transduction TRIF qui est commune avec celle employée par le TLR3 (Takeuchi and Akira, 2010). Les TLR7 et TLR9 étant exprimés spécifiquement par un sous type de DC, les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), ces cellules seront les principales productrices d'IFN-I dans les réponses antivirales et feront l'objet d'une partie spécifique dans la suite du mémoire.

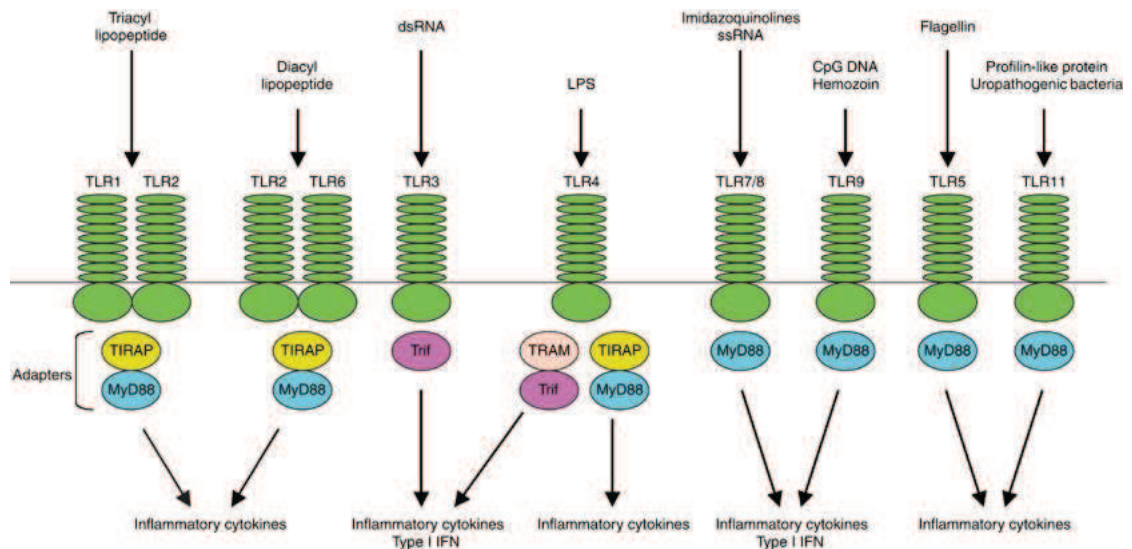


Figure 1 : La réponse TLR dans l'immunité innée. Les hétérodimères TLR1/TLR2 et TLR6/TLR2 reconnaissant les lipoprotéines, le TLR4 liant le LPS et le TLR5 reconnaissant la flagelline vont induire une production de cytokines pro-inflammatoires par l'intermédiaire de la voie MyD88. Le TLR7 et le TLR9 vont induire une production d'IFN-I aussi par la voie MyD88, de même que les TLR3 et TLR4 mais par l'intermédiaire de la voie TRIF. (D'après (Kawai and Akira, 2006)).

D'autres types de récepteurs sont capables de capter des motifs issus des pathogènes pour activer les effecteurs de l'immunité innée. En effet, les récepteurs transmembranaires à lectine de type C (CLRs), les récepteurs cytoplasmiques de type RIG-1 (RLRs) qui vont reconnaître les ADN et ARN viraux, ainsi que ceux de la famille des NLRs qui vont détecter les peptidoglycanes bactériens, sont capables d'activer les réponses immunes suite à une infection par un pathogène (Takeuchi and Akira, 2010).

Les DAMPs produits par les cellules endommagées ou en condition de stress vont également être capables d'activer le système immunitaire. HMGB1 pour *high mobility group box 1* est une de ces alarmines qui est maintenant bien décrite. C'est une protéine nucléaire non-histone capable de se lier à l'ADN afin de favoriser l'assemblage des complexes nucleo-protéiques (Thomas, 2001). HMGB1 peut être libérée par les cellules mourant par nécrose et induire une inflammation mesurée par la sécrétion de TNF (Scaffidi *et al.*, 2002). Il a également été reporté que HMGB1 pouvait être sécrétée par des monocytes activés (Gardella *et al.*, 2002). En outre, HMGB1 contient deux cystéines, C23 et C45 en particulier, qui en fonction de leur état d'oxydo-réduction vont définir le type de réponses induites par la protéine. En effet, la forme réduite (CySH) va permettre le recrutement au site inflammatoire de leucocytes, tandis que la forme oxydée (CySO₃⁻) va induire la sécrétion de cytokines inflammatoires par les macrophages comme le TNF par exemple (Venereau *et al.*, 2012). Une fois libérée par la cellule, HMGB1 va interagir avec de nombreuses molécules, lui permettant ainsi de se lier à différents récepteurs. Par exemple, en se liant au LPS, HMGB1 va former un complexe capable d'induire une plus grande sensibilité du TLR4/MD-2 et provoquer un effet synergique sur la sécrétion de TNF par les monocytes (Youn *et al.*, 2008). La liaison préférentielle de HMGB1 avec l'ADN va conduire à la formation de complexe HMGB1/ADN qui va se lier avec RAGE pour *receptor for advanced glycation end-products*, le principal récepteur de HMGB1

décrit à ce jour, et qui va permettre à l'ADN de rentrer dans le milieu intracellulaire afin d'activer les réponses immunitaires (Sims *et al.*, 2010). Ainsi des complexes HMGB1/CpG ont montré une capacité à augmenter de façon dépendante du TLR9 et de RAGE, la réponse IFN-I par les pDC (Tian *et al.*, 2007). Cette capacité à activer les réponses immunes par de nombreuses voies a permis d'impliquer HMGB1 dans la physiopathologie de plusieurs maladies auto-immunes dont la polyarthrite rhumatoïde (Kokkola *et al.*, 2003), le lupus érythémateux disséminé (SLE) (Urbonaviciute *et al.*, 2008) et la sclérodermie (Yoshizaki *et al.*, 2009).

Le récepteur RAGE est aussi capable de lier d'autres alarmines que HMGB1, comme les protéines de la famille S100 provoquant une forte inflammation dans des modèles murins de colite (Hofmann *et al.*, 1999). Si HMGB1 est l'alarmine à ce jour la plus étudiée, il existe d'autres DAMPs capables d'activer les réponses innées comme les protéines de choc thermique (HSPs pour *heat shock proteins*) ou l'acide urique (Bianchi, 2007).

1.1.2 Régulation des réponses inflammatoires par la compartimentation des PRRs

Toutes ces voies permettant l'activation du système immunitaire par l'intermédiaire de différents récepteurs nécessitent un certain degré de régulation. Car si le système de reconnaissance des pathogènes semble fonctionner de façon spécifique, il n'est pas intuitif de penser que tous ces récepteurs, puissent par eux même, faire la différence entre un microorganisme commensal ou pathogène, entre un acide nucléique d'origine du soi ou viral. En effet, les motifs reconnus par les PRRs, comme le LPS ou les acides nucléiques, vont être communs entre les différents microorganismes quel que soit leur degré de pathogénicité. C'est donc grâce à la compartimentation au sein de ces réponses que leur intensité sera régulée. Au niveau intestinal par exemple, les cellules épithéliales qui sont à l'interface entre la flore commensale, non pathogène, et la circulation systémique, vont exprimer des TLR permettant la reconnaissance des motifs bactériens mais uniquement au niveau de leur pôle basolatéral (Abreu, 2010). Ceci va permettre leur activation uniquement dans le cas d'une invasion bactérienne pathogène de la flore intestinale. Si les pathogènes passent cette barrière épithéliale, les DC seront alors activées grâce à l'engagement du TLR5 par la flagelline, par exemple, et s'ensuivra alors la sécrétion par ces cellules de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-12 (Uematsu *et al.*, 2006). Il se peut que l'infection ne soit pas contrôlée à ce stade. Alors, l'infection va se propager dans les différents compartiments de l'organisme provoquant des réponses de plus en plus fortes jusqu'à une activation adéquate et être totalement contrôlée (Iwasaki and Medzhitov, 2015). La localisation des PRRs au sein des différents compartiments des cellules immunitaires va également être importante pour assurer une réponse spécifique aux pathogènes. En effet, comme décrit précédemment, certains TLR sont exprimés en surfaces et d'autres comme le TLR7 et TLR9 dans le compartiment endosomal. Ce sont les acides nucléiques qui vont activer les TLR intracellulaires. Il a été montré que ces TLR étaient aussi capables de reconnaître des acides nucléiques du soi, et donc favoriser le développement de maladies auto-immunes comme le SLE (Marshak-Rothstein, 2006). En particulier, l'implication du TLR9 reconnaissant un complexe ADN-

HMGB1 dans le développement du SLE a été explicitement montrée (Tian *et al.*, 2007). Plus généralement, la stimulation TLR par de l'ADN du soi est associée à des désordres auto-immuns (Boule *et al.*, 2004). Grâce à leur localisation intracellulaire, ces TLR n'activent pas de manière aberrante le système immunitaire en condition normale. En effet, en condition physiologique, seuls les pathogènes infectant les cellules vont fournir des ligands aux TLR7 et TLR9. Cependant, les conditions permettant aux acides nucléiques du soi d'entrer dans le cytoplasme des cellules immunitaires sont pour le moment peu décrites. Il a été proposé malgré tout, que dans le cadre de maladies auto-immunes, les ADN du soi pourraient résister à leur dégradation par les DNases endosomales, car protégés par des auto-anticorps au sein de complexes immuns (Barton and Kagan, 2009). La répartition des PRRs dans différents compartiments va donc permettre en condition normale, de fournir une réponse adaptée au degré d'intrusion des organismes pathogènes. Ainsi en cas d'échec du contrôle des infections aux stades primaires, les pathogènes vont progressivement activer d'autres PRRs provoquant leur éradication par les différents effecteurs de l'immunité.

1.1.3 Les ligands de PRRs dans la modulation des réponses innées

Si la compartimentation des PRRs est importante dans la régulation des réponses inflammatoires, le type de ligands activant ces récepteurs va influencer les réponses qui vont être induites. Ainsi les TLR2 et TLR4 peuvent jouer un rôle dans les dommages du myocarde causés par des phénomènes d'ischémie/reperfusion (Arumugam *et al.*, 2009). Dans ce contexte le TLR4 va être capable de reconnaître et d'être activé par une molécule de stress cellulaire comme la HSP70, et provoquer la sécrétion de TNF (Dybdahl *et al.*, 2002). Ainsi, l'utilisation d'un antagoniste de TLR4, l'éritoran, va permettre de diminuer les dommages du myocarde suite à l'ischémie/reperfusion (Shimamoto *et al.*, 2006). Plus généralement l'implication des TLR2 et TLR4 dans des mécanismes d'inflammation stérile, non dépendante de PAMPs, a conduit à identifier des ligands de stress cellulaire capables d'induire une réponse TLR médiée. Ainsi de nombreuses HSPs, comme HSP60, gp96 et HSP22 sont capables de reconnaître les TLR2 et TLR4 (Ohashi *et al.*, 2000; Roelofs *et al.*, 2006; Warger *et al.*, 2006). A l'inverse certaines stimulations des TLR peuvent conduire à des phénomènes de tolérance. En reprenant l'exemple du TLR4, un traitement par le LPS va conduire à une amélioration des dommages d'ischémie/reperfusion dans l'intestin ischémique (Chen *et al.*, 2008a). Cette tolérance induite par le LPS est un mécanisme maintenant bien décrit, qui va conduire des animaux prétraités avec une dose non létale de LPS à produire une inflammation moins importante et à une meilleure survie lors d'un traitement avec une dose normalement létale de LPS (Medvedev *et al.*, 2006). Cette tolérance est en grande partie due à une anergie des macrophages qui vont être moins sensibles aux stimulations LPS et sécréter moins de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF ou l'IL1- β (Zuckerman and Evans, 1992). Ces voies d'activation de l'immunité innée vont donc permettre tout un panel de réponses selon le type de stimulus perçu. Ces signaux vont être détectés par les effecteurs de l'immunité innée entraînant ensuite différents types de réponses.

1.2 Les effecteurs de l'immunité innée

1.2.1 Les phagocytes : neutrophiles et macrophages

Lors d'une infection ou d'un stress cellulaire conduisant à la mise en place d'une réponse inflammatoire, les premières cellules recrutées sont les polynucléaires neutrophiles. Ces cellules sont produites dans la moelle osseuse (MO) à partir de progéniteurs myéloïdes. Leur maturation est contrôlée par le facteur de croissance G-CSF pour *granulocyte colony stimulating factor* (Lieschke *et al.*, 1994) sécrété en réponse à l'IL-17 produite par les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les lymphocytes T natural killer (Ley *et al.*, 2006). Les neutrophiles matures vont alors exprimer CXCR4, un récepteur de rétention des cellules dans la MO, et en parallèle CXCR2, un récepteur qui va favoriser leur passage vers la circulation systémique au contact des chémokines CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 et CXCL8 (Nauseef and Borregaard, 2014). Une fois dans la circulation, les neutrophiles ont une durée de vie limitée de quelques heures, à part s'ils sont recrutés sur le site inflammatoire. Les macrophages résidants dans les tissus cibles de l'inflammation, vont générer un microenvironnement pro-inflammatoire en produisant des cytokines comme le TNF et l'IL-1 β (Kolaczkowska and Kubes, 2013). Ces cytokines vont permettre l'adhésion des neutrophiles et leur extravasation grâce à la reconnaissance de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales comme ICAM-1 par l'intégrine β 2 sur les neutrophiles (Nauseef and Borregaard, 2014). Une fois sur le site de l'inflammation, les neutrophiles vont utiliser tout un arsenal pour éliminer l'agresseur. En premier lieu, les neutrophiles sont capables de phagocyter les pathogènes qui vont être détruits à l'intérieur du phagosome, par l'intermédiaire de mécanismes dépendants de la NADPH oxygénase produisant des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), et de protéines antibactériennes telles que le lysozyme ou les cathepsines (Kolaczkowska and Kubes, 2013). Les neutrophiles sont également capables de libérer le contenu de leurs granules pour tuer les pathogènes extracellulaires. Enfin, les neutrophiles très activés vont également produire et sécréter des *neutrophil extracellular traps* (NETs) composés d'ADN de neutrophile lié à des protéines antibactériennes et à des enzymes. Ces NETs vont piéger et empêcher la dissémination des pathogènes dans l'organisme. Si les neutrophiles ont longtemps été considérés comme des cellules uniquement capables de répondre à des stimuli non spécifiques comme à la présence de cytokines pro-inflammatoires, il apparaît aujourd'hui clairement qu'ils sont capables de reconnaître finement la présence de pathogène. En effet, ces cellules possèdent à l'instar des macrophages, la plupart des TLR à l'exception du TLR3, ainsi que d'autres PRRs comme les NLRs et les CLR (Thomas and Schroder, 2013). Ainsi les neutrophiles sont sensibles aux ligands de TLR permettant l'extension de leur durée de vie, notamment par l'intermédiaire des TLR4 et TLR2. L'activation en particulier du TLR4 va permettre la transduction du signal passant par la protéine adaptatrice MyD88 activant les facteurs de transcriptions NF- κ B et MAPK (pour *mitogen-activated protein kinase*) favorisant la survie de ces cellules (Sabroe *et al.*, 2003). Cependant, la plupart des études traitant de l'activation des neutrophiles par les PRRs se font *in vitro* et il reste à démontrer la relevance de ses données dans un contexte inflammatoire *in vivo*.

Les macrophages sont un autre type de cellules spécialisées dans la phagocytose de débris cellulaires, de cellules mortes et de corps étrangers tels que des pathogènes. Ces cellules myéloïdes peuvent avoir différentes origines. D'une part, les macrophages peuvent être issus de cellules embryonnaires et être résidents de tissus spécifiques, et d'autre part provenir du passage de monocytes sanguins Ly6C^{high} qui vont se différencier en macrophages en rentrant dans les tissus cibles (Varol *et al.*, 2015). Les macrophages résidents de tissus vont plutôt avoir pour rôle de détecter les infections ou les stress cellulaires pour recruter d'autres cellules effectrices, dont les macrophages dérivés de monocytes. Les macrophages dérivés de monocytes vont être recrutés aux sites inflammatoires pour lutter contre les différents dommages cellulaires et infections grâce à leurs fonctions effectrices. Les macrophages peuvent également être classés en familles, définies par leur activité fonctionnelle et leur sécrétome. Classiquement deux sous populations de macrophages nommées M1 et M2 ont été décrites. Les macrophages activés par l'IFN- γ et le LPS vont acquérir un profil dit M1 et participer à la mise en place de réponses inflammatoires comme la polarisation de lymphocytes T (LT) naïfs en LT effecteurs. Ces LT effecteurs vont être les Th1 et les Th17, respectivement producteurs des cytokines pro-inflammatoire IFN- γ et IL-17. Les macrophages activés par de l'IL-4 et de l'IL-13 vont eux acquérir un profil dit M2 porteurs de fonctions régulatrices de résolution de l'inflammation, et favorisant la polarisation des LT en Th2 impliqués dans les réponses antiparasitaires et allergiques (Gordon and Taylor, 2005). Plus récemment il a été admis que les macrophages sont une population de cellules très plastiques, dont le phénotype et les fonctions vont grandement changer en fonction du microenvironnement. Par exemple le GM-CSF (pour *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) va induire un profil de macrophages de type M1, sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF et l'IL-1 β mais en moindre quantité que des macrophages stimulés en LPS. Les glucocorticoïdes vont eux induire un profil de type M2 différent des macrophages stimulés en IL-4, présentant notamment une production d'IL10 qui va favoriser les réponses de type Th2 (Martinez and Gordon, 2014). Les études sur les différentes manières de polariser les macrophages se déroulent en majorité *in vitro*, et il apparaît aujourd'hui que la multiplicité des profils de macrophages *in vivo* est extrêmement étendue et va dépendre de la composition précise du microenvironnement. Ces cellules phagocytaires professionnelles vont reconnaître leurs cibles grâce à toute une série de récepteurs présents à leur surface. Parmi eux, il y a les PRRs dont les TLR comme le TLR4 qui va reconnaître le LPS bactérien, et activer la voie MyD88 et induire la production de TNF. L'engagement des TLR peut également activer la voie de signalisation TRIF et induire la production d'IFN-I comme l'IFN- β (Mosser and Edwards, 2008). Cette sécrétion de cytokines va permettre l'entretien de l'activation des macrophages pendant toute la durée de la phase inflammatoire. Il existe également d'autres récepteurs sur les macrophages qui vont permettre la capture des éléments cellulaires à phagocyter. Les récepteurs *scavenger* comprenant des récepteurs tels que SR-A I/II, MARCO et CD36 vont être capable de lier différents types de pathogènes, ainsi que les cellules apoptotiques par l'intermédiaire de composés polyanioniques et d'acides gras diacylés (Taylor *et al.*, 2005). Les

macrophages ont également la possibilité de reconnaître des composés cellulaires opsonisés par la partie Fc d'immunoglobulines G (IgG) par l'intermédiaire de récepteurs Fc (Fcγ-R).

Il existe deux grands types de Fcγ-R, ceux activateurs associés à des domaines intracellulaires ITAM (pour *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), et ceux inhibiteurs associés à des domaines intracellulaires ITIM (pour *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) (figure 2). Dans le cas des Fcγ-R activateurs, leur liaison avec un complexe immunitaire va induire la phosphorylation des domaines ITAM par une protéine tyrosine kinase de la famille SRC, puis une cascade de phosphorylation impliquant les kinases de la famille SYK (Kiener *et al.*, 1993). Au final, l'activation de cibles comme la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) va conduire à la production d'un signal de phagocytose (Aderem and Underhill, 1999). L'engagement des Fcγ-R sur les macrophages va aussi moduler leur capacité à sécréter certaines cytokines. Ainsi les macrophages soumis à une stimulation du TLR4 par le LPS et dont le Fcγ-R est lié, vont sécréter moins d'IL-12, une cytokine favorisant la polarisation des LT en Th1, mais plus d'IL-10, de TNF et d'IL-6 que des macrophages seulement stimulés par du LPS, leur conférant ainsi un profil de type M2 (Sutterwala *et al.*, 1997). Enfin le contrôle de l'activation des macrophages par les Fcγ-R va se faire grâce au Fcγ-RIIB inhibiteur, qui en cas de déficience va causer une sensibilité accrue à des pathologies auto-immunes comme l'arthrite (Yuasa *et al.*, 1999). Si le Fcγ-R est capable d'activer le macrophage, il est également capable d'activer les cellules fixées sur la partie hypervariable de l'Ac. Ce rétro-signal, appelé effet mitogénique, est bien décrit et associé à l'utilisation de l'anticorps anti-CD3 (Ac αCD3), et particulièrement des clones OKT3 chez l'Homme et 145-2C11 chez la souris. Dans le cas de cet anticorps, qui va cibler l'antigène CD3 à la surface des LT, son administration *in vivo* va provoquer une forte activation des LT caractérisée par la production d'IL-2 et la prolifération de ces cellules (Alegre *et al.*, 1995; Rinnooy Kan *et al.*, 1986). Il a été montré que cet effet mitogénique était dépendant de la présence des cellules porteuses de Fcγ-R, et qu'en leur absence, l'Ac αCD3 ne provoquait pas d'activation des LT (Palacios, 1985). De la même façon, l'utilisation d'un Ac αCD3 dépourvu de partie Fc (F(ab')₂) ne provoquera pas cet effet mitogénique (Alegre *et al.*, 1995). La liaison de la partie Fc de l'Ac anti-CD3 au Fcγ-R des macrophages, va donc permettre l'engagement du complexe TCR/CD3 sur les LT, et transduire un signal activateur *via* le TCR, permettant la sécrétion de cytokines inflammatoires par les LT ainsi que leur prolifération (Alegre *et al.*, 1995; Rinnooy Kan *et al.*, 1986). L'effet mitogénique associé à cet Ac sera décrit en détail par la suite (voir partie III-2.3). Les macrophages sont donc des effecteurs importants de l'immunité innée, fortement impliqués dans la régulation des phénomènes inflammatoires.


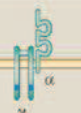







	Activating Fc receptors					Inhibitory Fc receptor
Mouse						
Structure						
Name	FcγRI	FcγRIII	FcγRIV	FcγRIIB		
Affinity	High	Low to medium	Low to medium	Low to medium		
Human						
Structure						
Name	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIC	FcγRIIIA	FcγRIIIB	
Affinity	High	Low to medium	Low to medium	Low to medium	Low to medium	
Alleles		FcγRIIA ^{131H} FcγRIIA ^{131R}		FcγRIIIA ^{131V} FcγRIIIA ^{131F}	NA1 NA2	
					FcγRIIIB ^{131T} FcγRIIIB ^{131F}	

Figure 2 : Les Fcγ-R chez l'Homme et chez la souris. Les Fcγ-R activateurs possédant un domaine intra-cytoplasmique ITAM sont Fcγ-RI, Fcγ-RIII et Fcγ-RIV chez la souris et Fcγ-RI, Fcγ-RIIA, Fcγ-RIIC, Fcγ-RIIIA et Fcγ-RIIIB chez l'Homme. Le Fcγ-R inhibiteur possédant un domaine intra-cytoplasmique ITIM est le Fcγ-RIIB chez l'Homme et la souris. Chez l'Homme comme chez la souris le récepteur ayant la plus grande affinité pour la partie Fc des IgG est le Fcγ-RI. Tous les autres Fcγ-R (Fcγ-RIIA, Fcγ-RIIB, Fcγ-RIIC et Fcγ-RIII) ont une affinité plus réduite à la partie Fc des IgG (D'après (Nimmerjahn and Ravetch, 2008)).

1.2.2 Les cellules natural killer et leurs mécanismes cytotoxiques effecteurs

Les cellules natural killer (NK) font partie de l'immunité innée et sont impliquées dans la réponse anti-tumorale et contre les infections. Chez l'Homme, les NK expriment spécifiquement le marqueur CD56, et représentent 10% des cellules mononucléées du sang, la plus grosse population après les LT et les lymphocytes B (LB) (Mandal and Viswanathan, 2015). Les NK sont d'origine myéloïde, générées dans la MO mais pouvant également provenir des ganglions périphériques (Freud *et al.*, 2005). Leur recrutement ainsi que leur activation se fait grâce à plusieurs cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, lors d'épisodes inflammatoires aussi hétérogènes que les réponses anti-tumorales ou antivirales, des cytokines telles que MIP-1α produite par les macrophages (Salazar-Mather *et al.*, 1998) ou encore le TNF (Smyth *et al.*, 1998) et l'IL-2 (Lovik *et al.*, 1995) vont permettre la migration des NK au site de conflit. D'autres cytokines vont être capables d'activer les NK comme l'IL-12 (Bancroft, 1993; Orange *et al.*, 1995) qui va conduire à la production d'IFN-γ, et les IFN-I qui vont augmenter les fonctions cytotoxiques anti-tumorales de ces cellules (Swann *et al.*, 2007). Pour médier leur fonction effectrice de cytotoxicité, les NK vont utiliser un système de récepteurs activateurs et inhibiteurs qui leur est propre, leur permettant de discriminer les cellules normales des cellules tumorales, infectées ou en situation de stress. Les récepteurs inhibiteurs peuvent être de type killer *Ig-like receptors* (KIR), *Ig-like* (CD158), de type lectine C (NKG2A) et inhibiteurs de leucocytes (LIR1, LAIR-1). Les récepteurs activateurs peuvent être des récepteurs cytotoxiques naturels (NKp46, NKp44), de type lectine C (NKG2D, NKG2C) et *Ig-like* (2B4) (Mandal and Viswanathan, 2015). C'est cette balance entre l'implication des récepteurs activateurs et des récepteurs

inhibiteurs qui va permettre aux NK d'activer leurs fonctions effectrices cytotoxiques. En effet, les NK ont par exemple la capacité de détecter *via* leurs récepteurs inhibiteurs le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Dans le cadre d'une réponse anti-tumorale, il a été montré que des tumeurs déficientes en CMH-I produisaient une réponse par les cellules NK bien plus forte que si les tumeurs expriment ce CMH-I (Glas *et al.*, 2000). A l'inverse, l'expression de ligands des récepteurs activateurs des NK par les cellules tumorales, comme MICA, une protéine homologue au CMH-I ligand de NKG2D, va activer la réponse effectrice anti-tumorale des NK (Bauer *et al.*, 1999). Ainsi, c'est cette balance de signaux activateurs et inhibiteurs qui va permettre aux NK de discerner les cellules à éliminer ou non.

Les NK, au même titre que les LT cytotoxiques, peuvent être classés dans la catégorie des lymphocytes cytotoxiques (Voskoboinik *et al.*, 2006). Ces lymphocytes cytotoxiques possèdent deux grands types de fonctions effectrices afin d'éliminer les cellules cibles. Le premier mécanisme est l'expression à la membrane cellulaire de molécules de la superfamille du TNF. Ces molécules sont des ligands des récepteurs de mort, comme FasL et TRAIL (pour *TNF related apoptosis-inducing ligand*) qui vont respectivement se lier au récepteur Fas/CD95 et aux récepteurs de TRAIL (DR4 et DR5), exprimés par les cellules cibles et induire l'apoptose de ces dernières (Arase *et al.*, 1995). L'engagement de ces récepteurs de mort va activer la voie extrinsèque de l'apoptose, qui comprend en premier lieu l'activation du domaine de mort FADD (pour *Fas associated death domain*) (Yuan, 1997). Ceci va induire la cascade d'activation des caspases en commençant par la caspase 8 qui va à son tour activer la caspase 3, débouchant sur la mort cellulaire par apoptose (figure 3) (Warren and Smyth, 1999). Par ailleurs, la cytokine TNF, premier membre des molécules de la superfamille du TNF, peut se lier au récepteur TNFR1 qui est associé au domaine de mort TRADD (figure 3) (pour *TNFR1-associated death domain*) qui va activer les caspases induisant l'apoptose cellulaire (Brenner *et al.*, 2015). Le TNF peut également se lier au TNFR2, qui ne possède pas de domaine TRADD, ce qui va plutôt favoriser la survie et la prolifération cellulaire *via* l'activation de NF- κ B (Brenner *et al.*, 2015).

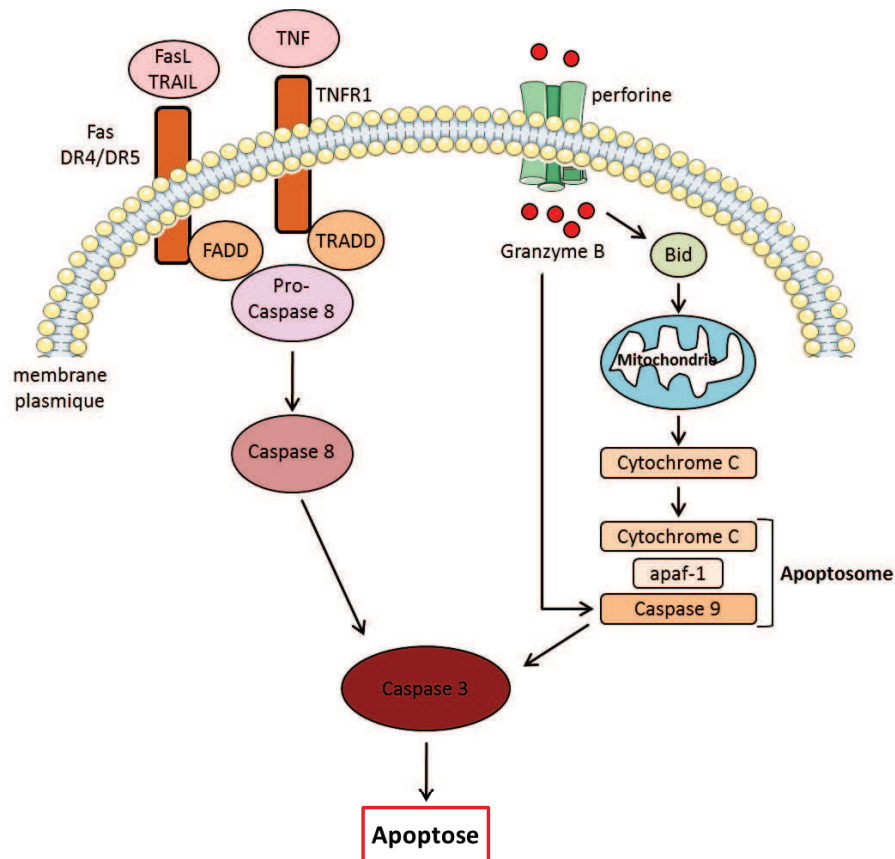


Figure 3 : Induction de l'apoptose par les récepteurs de mort et le système perforine/granzyme. L'engagement des récepteurs de FasL et TRAIL (Fas et DR4/DR5) et celui du récepteur au TNF (TNFR1) vont respectivement activer les domaines de mort FADD et TRADD. FADD et TRADD vont cliver la pro-caspase 8 pour l'activer en caspase 8 qui va à son tour activer la caspase 3 responsable de l'apoptose. Le granzyme B entré dans le milieu intracellulaire par l'intermédiaire de la perforine va activer le facteur pro-apoptotique Bid, qui va induire le relargage du cytochrome c capable de former avec Apaf 1 et la caspase 9 l'apoptosome activateur de la caspase 3. Le granzyme B peut aussi activer directement la caspase 9 et induire l'apoptose.

L'autre mécanisme cytotoxique permettant la mort des cellules cibles, est le système perforine/granzyme. Une fois la cellule cible reconnue par le lymphocyte cytotoxique, celui-ci va augmenter sa concentration en Ca^{2+} (Voskoboinik *et al.*, 2015). Le centre d'organisation des microtubules (MTOC) va alors permettre le transport et la sécrétion des granules cytotoxiques au niveau de la cellule cible (Kuhn and Poenie, 2002). Ces granules vont contenir la perforine qui va former des pores à la membrane plasmique de la cellule cible à pH neutre et en présence de Ca^{2+} (Voskoboinik *et al.*, 2015). Bien que le mécanisme reste encore discuté, les pores formés par la perforine vont permettre au granzyme de rentrer dans la cellule cible et médier leur action (Lopez *et al.*, 2013) (Figure 4). Les granzymes sont des sérines protéases qui ont été découvertes dans les granules cytotoxiques dès 1987 (Masson and Tschopp, 1987). Parmi les fonctions de cette famille de protéines, la plus importante est l'induction de l'apoptose (Shi *et al.*, 1992). C'est le granzyme B qui va avoir l'activité pro-apoptotique la plus importante parmi l'ensemble des granzymes. Son activité passe par l'activation de Bid et le relargage de cytochrome c par

les mitochondries, et par une action directe sur la pro-caspase 9 (figure 3) (Sutton *et al.*, 2003). Cette activité engendre l'apoptose et la mort cellulaire en 5 à 8 minutes (Lopez *et al.*, 2013). Cependant chez la souris, le granzyme B a plutôt tendance à directement activer les caspases sans passer par la voie impliquant Bid et le cytochrome c (Kaiserman *et al.*, 2006). Ce sont tous ces mécanismes qui vont permettre aux lymphocytes cytotoxiques de tuer certaines cellules dans un contexte tumoral ou inflammatoire.

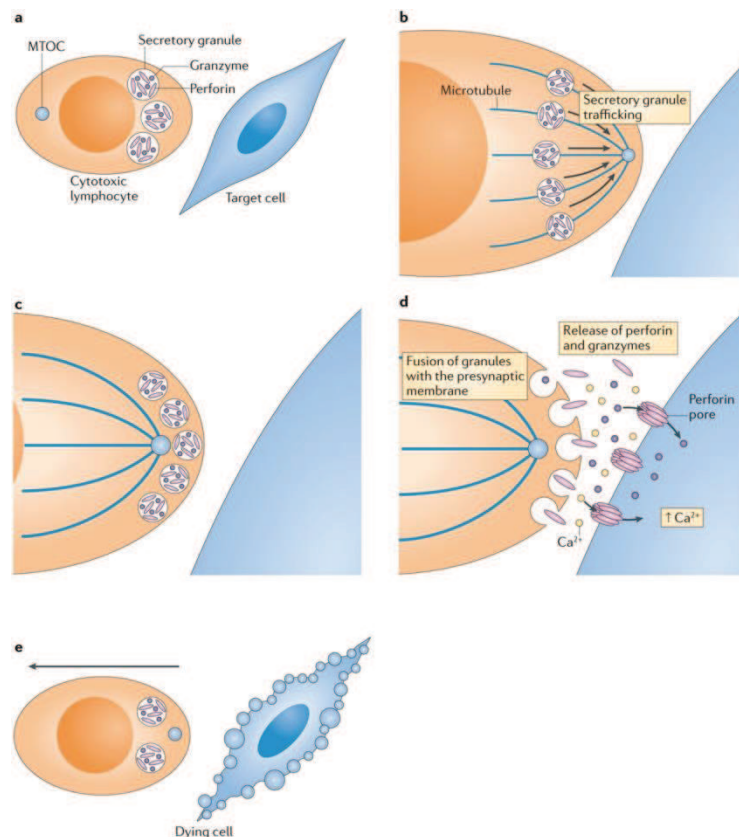


Figure 4 : Sécrétion des granules cytotoxiques et leur effet sur les cellules cibles. (A) Le lymphocyte cytotoxique va reconnaître sa cellule cible et former une synapse immunologique par l'intermédiaire de différents récepteurs. (B) Le centre d'organisation des microtubules (MTOC) va orienter les granules de sécrétion vers la membrane pré-synaptique. (C-D) Les granules de sécrétion vont fusionner avec la membrane et libérer les perforines et granzymes au sein de la synapse immunologique. (d) Les perforines vont former des pores à la surface de la cellule cible afin de permettre aux granzymes de rentrer dans le cytoplasme des cellules cibles. (E) Les granzymes vont induire l'apoptose de la cellule cible et le lymphocyte cytotoxique va se détacher afin de trouver une nouvelle cible. (D'après (Voskoboinik *et al.*, 2015)).

2. Les cellules dendritiques à l'interface avec l'immunité adaptative

2.1 Caractéristiques des cellules dendritiques

Les DC font partie des cellules de l'immunité innée et sont particulièrement impliquées dans les mécanismes de détection et de présentation de l'antigène. Elles sont en effet décrites comme étant des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) professionnelles tout comme les macrophages et les lymphocytes B. Cette capacité de présentation antigénique va permettre aux DC d'orienter la réponse immunitaire, ce qui à cet égard leur confère leur particularité au sein du système immunitaire (Banchereau and Steinman, 1998; Hart, 1997). Les DC ont été identifiées pour la première fois par Ralph Steinman au début des années 1970 (Steinman *et al.*, 1975; Steinman and Cohn, 1973) et ont hérité de leur nom d'après leur morphologie caractérisée par de longs prolongements cytoplasmiques ou dendrites. Par la suite, les DC ont été définies comme les cellules servant d'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. En effet, ces cellules sont capables d'activer les LT naïfs (Hart, 1997) une fois qu'elles ont été activées par la capture de l'antigène. L'acquisition d'un phénotype mature par les DC va être caractérisée par l'expression de molécules du CMH de classe II (CMH-II), permettant la présentation antigénique, et par l'expression de molécules de co-stimulation permettant une activation spécifique de l'antigène des LT et des LB au sein des organes lymphoïdes secondaires (Nussenzweig *et al.*, 1980). L'ensemble du devenir des DC suite à la capture de l'antigène est résumé dans la figure 5. Le type d'antigène capté par la DC va conditionner la réponse immunitaire. Si l'antigène est dérivé de pathogènes, la DC va induire une polarisation des LT naïfs en LT effecteurs. En revanche, la DC est également en charge de maintenir la tolérance périphérique aux antigènes du soi dans l'organisme. Dans ce cadre, en présentant aux lymphocytes les Ag dérivés du soi, la DC peut provoquer l'anergie et la délétion des lymphocytes auto-réactifs en même temps que l'induction de lymphocytes T régulateurs (Steinman, 2003; Steinman *et al.*, 2003). Les DC sont donc les chefs d'orchestre de la réponse adaptative en favorisant une réponse virulente vis-à-vis d'antigènes pathogènes ou, au contraire, une réponse régulatrice pour le maintien de la tolérance au soi.

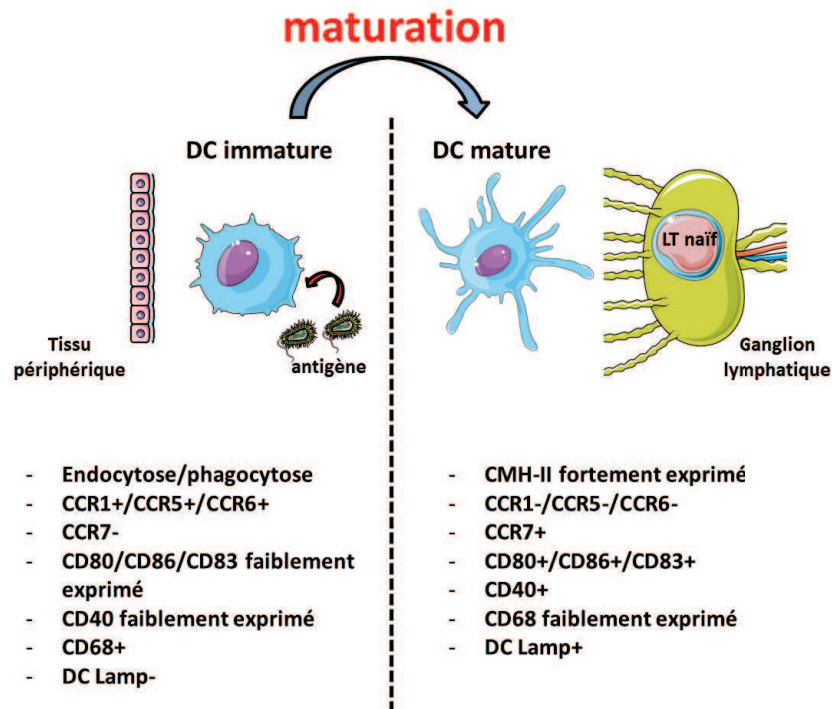


Figure 5 : Maturation des cellules dendritiques. Les DC au stade immature vont agir comme des sentinelles du système immunitaire. Elles vont se retrouver au site inflammatoire grâce à certains récepteurs aux chémokines tels que CCR1/CCR5/CCR6, afin de capturer les antigènes issus de DAMP et de PAMPs présents. Cela va induire la maturation des DC qui vont alors exprimer le CCR7, un récepteur de domiciliation aux organes lymphoïdes. Une fois que les DC ont migré dans les organes lymphoïdes, elles vont exprimer le CMH-II afin de présenter l'antigène ainsi que des molécules de co-stimulation telles que CD80/CD86/CD83 pour activer les lymphocytes T et B naïfs.

2.2 Les différentes sous populations de cellules dendritiques

Il existe plusieurs sous types de cellules dendritiques qui vont diverger de par leurs fonctions et le type de réponse qu'elles vont induire. Tout d'abord, les DC peuvent être divisées en deux grandes familles, les DC conventionnelles (cDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC). Les cDC vont ensuite pouvoir être classées en plusieurs sous populations, toutes exprimant un marqueur spécifique, le CD11c, commun à la souris et à l'Homme (Merad *et al.*, 2013). Parmi les cDC, on retrouve les DC résidentes, domiciliées dans les organes lymphoïdes ainsi que dans la circulation sanguine. Il en existe deux types, les cDC CD8⁺CD11b⁻ et les CD11b⁺CD8⁻ sont décrites chez la souris (Haniffa *et al.*, 2013; Merad *et al.*, 2013), et les cDC BDCA1⁺ et les cDC BDCA3⁺XCR1⁺, décrites chez l'Homme. Les cDC BDCA1⁺ montrent une forte homologie avec les cDC CD11b⁺ murines (Lindstedt *et al.*, 2005; Robbins *et al.*, 2008), et les cDC BDCA3⁺XCR1⁺ sont les homologues des cDC CD8⁺ murines (Bachem *et al.*, 2010; Crozat *et al.*, 2010; Poulin *et al.*, 2010). Le deuxième grand sous type de cDC est celui des cDC migratoires, en grande majorité localisées dans la peau et les muqueuses. Une fois activées, ces DC migrent au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Chez la souris, trois grandes familles de cDC migratoires sont décrites, au niveau de l'épiderme les cellules de Langerhans (LC) (Merad *et al.*, 2008), les cDC CD103⁺CD11b⁻ (proches des

cDC CD8⁺) au niveau des organes lymphoïdes, et enfin les cDC CD11b⁺ (Haniffa *et al.*, 2013; Merad *et al.*, 2013). Les cDC CD103⁺CD11b⁺ ont aussi été décrites chez la souris et spécifiques de l'intestin et des poumons (Merad *et al.*, 2013). Chez l'Homme on compte quatre sous populations de cDC migratoires, les LC dans l'épiderme, et les DC BDCA1⁺CD1a⁺, les DC BDCA3⁺ XCR1⁺ et les DC CD14⁺ au niveau du derme, (Haniffa *et al.*, 2012; Merad *et al.*, 2013; Nestle *et al.*, 1993). Ces trois dernières sous populations n'ont pas d'homologue identifié chez la souris. Le phénotype et la fonction des pDC seront décrits plus loin. Chacune de ces sous populations de cDC va activer de manière différente le système immunitaire, et ce, en fonction du signal activateur.

2.3 Polarisation des LT par les cellules dendritiques conventionnelles lors de la réponse inflammatoire

Si les cellules de l'immunité innée sont capables de capter un certain nombre de signaux de danger par l'intermédiaire de leurs PRRs, elles ne sont cependant pas capables de reconnaître de façon spécifique l'antigène. Ce sont les LT qui, par l'intermédiaire de leur récepteur (TCR) spécifique de l'antigène, vont pouvoir mettre en place une réponse adaptative pour lutter contre les agressions qui n'ont pas pu être éliminées par l'immunité innée. Pour cela, les LT doivent être activés en LT effecteurs par les cDC qui leur présentent l'antigène *via* leurs CMH-II et CMH-I dans un contexte cytokinique produit par les effecteurs de l'immunité innée. Chaque type de LT effecteur va être caractérisé par son sécrétome, et sera impliqué dans différents types de réponses. Certaines sous populations de cDC vont être plus efficaces à favoriser une polarisation de LT en un certain type de LT effecteur. En effet, selon les cytokines qui composent le microenvironnement des LT, ceux-ci vont être polarisés en différents effecteurs, et les cDC sont capables d'influencer cette polarisation. Les LT effecteurs peuvent être classés en sous populations pro-inflammatoires ou régulatrices. Les principaux LT effecteurs CD4⁺ pro-inflammatoires sont les Th1 impliqués principalement dans les réponses anti-bactériennes, les Th2 impliqués dans les réponses allergiques et anti-parasitaires, et les Th17 apportant une réponse anti-bactérienne et antivirale. Les LT effecteurs CD8⁺ sont principalement les LT cytotoxiques (CTL) qui vont jouer un rôle dans la lutte antivirale et anti-tumorale en induisant la lyse des cellules cibles. Enfin les principaux LT effecteurs régulateurs sont les Treg issus des LT CD4⁺ qui vont permettre le contrôle des réponses inflammatoires et ainsi maintenir un état de tolérance. Seule la polarisation de sous types de LT pro-inflammatoires sera présentée ici, même si les cDC vont également jouer un rôle décisif dans la polarisation des Treg (figure 6).

2.3.1 La polarisation de type Th1

Les LT dits Th1, pour LT effecteur (ou *helper*) de type 1, vont être induits en réponse aux infections virales, bactériennes et par les protozoaires, à partir de LT CD4⁺ naïfs. Les Th1 vont exprimer spécifiquement le facteur de transcription TBX21 et produire différentes cytokines pro-inflammatoires comme le TNF et l'IFN- γ (figure 6). L'IFN- γ va permettre l'activation de fonctions antibactériennes par exemple, comme la production d'acide nitrique par les macrophages. Il est également doué d'une activité

antivirale propre et, il permet aussi l'activation des LT CD8⁺ cytotoxiques (CTL) qui vont tuer les cellules infectées par un virus (Walsh and Mills, 2013). L'activation des DC par les voies TLR va jouer un rôle crucial dans la polarisation Th1. Les TLR4, TLR5 et TLR3 vont permettre l'activation du facteur de transcription NF-κB (Takeuchi and Akira, 2010; Walsh and Mills, 2013) conduisant la DC à sécréter différentes cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, l'IL-6 ou encore l'IL-12p40. L'IL-12p40 s'associe à l'IL-12p35 pour former un hétérodimère fonctionnel, IL-12p70 (Walsh and Mills, 2013). L'IL-12p35 va être produite par les DC suite à leur stimulation par l'IFN-γ (Trinchieri and Sher, 2007), sécrété entre autres par les NK ou les Th1 (figure 6). L'IL-12 est la principale cytokine responsable de la polarisation Th1. Cette cytokine va être sécrétée en grande partie par les cDC lymphoïdes CD8⁺, ainsi que par leurs homologues périphériques CD103⁺ (Edelson *et al.*, 2011; Mashayekhi *et al.*, 2011). Chez la souris c'est donc cette sous population de DC qui va être majoritairement responsable de la polarisation Th1 (Igyarto *et al.*, 2011), suite à sa stimulation par les TLR (figure 7). Chez l'Homme les DC BDCA3⁺ XCR1⁺, homologues des DC CD8⁺ et CD103⁺ de la souris, sont également de fortes productrices d'IL12, et donc capables d'induire une réponse Th1 (Jongbloed *et al.*, 2010; Poulin *et al.*, 2010).

2.3.2 La polarisation de type Th2

La réponse Th2 est induite notamment dans la lutte contre les helminthes ainsi qu'en réponse aux allergènes. Les Th2 proviennent des LT CD4⁺ naïfs et expriment spécifiquement le facteur de transcription GATA3. De plus, les Th2 produisent des cytokines caractéristiques telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (figure 6) (Allen and Maizels, 2011). L'IL-4, la principale cytokine sécrétée par les LT Th2 est nécessaire à leur polarisation. De plus, elle permet la commutation isotypique des LB qui vont ainsi produire des IgG1 et des IgE (Walsh and Mills, 2013). L'IL-4 va également permettre l'activation des macrophages qui vont jouer un rôle dans la réparation tissulaire (Chen *et al.*, 2012a). Ce sont les PRRs qui permettent la reconnaissance des helminthes, et ainsi la mise en place d'une réponse Th2. Il semble que les voies TLR ne soient pas du tout impliquées dans l'activation des DC en réponse aux helminthes. En effet, l'absence des voies TLR MyD88 et TRIF, n'empêche pas la mise en place d'une réponse Th2 contre des parasites (Steinfeldt *et al.*, 2009). En revanche, l'exposition de DC humaines à des antigènes dérivés d'œufs de schistosome permet la mise en place d'une réponse Th2 par l'intermédiaire des récepteurs de type lectine C (CLR) et des récepteurs au mannose (van Liempt *et al.*, 2007). Chez la souris, il semble que les sous populations de DC du derme n'exprimant pas le CD207, à savoir les DC CD11b⁺, sont indispensables à la mise en place de la réponse Th2 (figure 7) (Kumamoto *et al.*, 2013; Murakami *et al.*, 2013). Chez l'Homme les LC et les DC migratoires BDCA1⁺ CD1a⁺ sont les plus efficaces pour initier une réponse Th2 (Segura *et al.*, 2012).

2.3.3 La polarisation de type Th17

Les Th17 proviennent aussi de LT CD4⁺ naïfs et sont caractérisés par l'expression spécifique du facteur de transcription ROR-γt, ainsi que par une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-

17, principalement, mais aussi par leur production d'IL-6, IL-22, de GM-CSF et de TNF (Walsh and Mills, 2013). Ces cellules sont impliquées dans la lutte antibactérienne et antifongique, et sont également mises en cause dans un certain nombre de pathologies auto-immunes (Mills, 2008). Des études sur la reconnaissance des signaux dangers par des NLR et surtout par des CLR tels que dectin-1 et dectin-2 exprimés par les DC, ont montré que ce type de récepteur était primordial pour l'initiation d'une réponse Th17 antifongique (figure 6) (Brown and Netea, 2012; Reid *et al.*, 2009; Robinson *et al.*, 2009). L'engagement de ces récepteurs par les DC passe par l'activation de la kinase Syk, qui va phosphoryler Card9 pour enfin activer NF-κB et induire la sécrétion de cytokines nécessaires à la différenciation Th17 (Strasser *et al.*, 2012). Ces cytokines peuvent également être produites par les DC ayant phagocyté des cellules infectées par des bactéries induisant la génération d'une réponse Th17 (Torhinsky *et al.*, 2009). Les principales cytokines participant à cette différenciation sont l'IL-6, l'IL-23, l'IL21 ainsi que le TGF-β, sachant que l'IL-6 et le TGF-β sont les cytokines cruciales permettant la polarisation Th17 (Bettelli *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006). Elles vont être en grande partie produites par certaines sous populations de DC, les DC CD103⁺CD11b⁺ intestinales ainsi que les LC chez la souris, et leurs homologues humains, les DC BDCA1⁺ (figure 7) (Persson *et al.*, 2013; Schlitzer *et al.*, 2013).

2.3.4 La polarisation des LT CD8⁺ cytotoxiques

Les CTL issus de LT CD8⁺ naïfs sont importants dans la lutte antivirale et anti-tumorale. Ils vont avoir pour fonction d'éliminer les cellules cibles grâce à des mécanismes de cytotoxicité similaires à ceux employés par les NK (voir partie 1.2.2). Les cytokines permettant la différenciation des LT CD8⁺ naïfs en CTL sont les IFN-I et l'IL-12 (Iwasaki and Medzhitov, 2015; Merad *et al.*, 2013). Chez la souris, ce sont les cDC résidentes CD8⁺ et les cDC migratoires CD103⁺ qui vont être les plus fortes productrices d'IL-12. Ces cDC expriment en effet des PRRs tels que des RLRs, des NLRs ainsi que le TLR3, et reconnaissent les ADN double brin viraux (Desch *et al.*, 2014; Desch *et al.*, 2011). Les cDC CD103⁺ et les CD8⁺ sont aussi les seules DC à exprimer XCR1, récepteur de la chémokine XCL1 produite par les LT CD8⁺. La lymphotactine-α (ou XCL1) concourt à la différenciation de LT CD8⁺ en CTL (Dorner *et al.*, 2009). Les cDC sont également capables de faire de la présentation croisée de l'antigène en plus de produire de l'IL-12, c'est-à-dire que les cDC peuvent aussi présenter l'antigène aux LT CD8⁺ par l'intermédiaire du CMH-I. Il a été montré que les cDC CD8⁺ ont cette capacité de présentation croisée et de polarisation des CTL (den Haan *et al.*, 2000). Au niveau des cDC migratoires, les cDC CD103⁺ ont une capacité de présentation croisée supérieure aux cDC CD11b⁺ (Heath and Carbone, 2009). Cette fonction de présentation croisée est associée à l'expression de la lectine C, CLEC9A, qui permet aux cDC la capture des cellules nécrotiques et qui va permettre d'induire une réponse cytotoxique spécifique d'Ag d'origine endogène et d'origine pathogène. Ainsi l'injection à des souris de fibroblastes exprimant la protéine ovalbumine (OVA), va permettre de créer une immunité anti-tumorale dépendante des CTL qui va être spécifique des cellules cancéreuses exprimant l'OVA (Zelenay *et al.*, 2012). De la même manière CLEC9A est en partie responsable de la mise en place d'une réponse antivirale, par la polarisation de CTL spécifiques dans un

modèle d'infection de souris avec HSV (Zelenay *et al.*, 2012). Chez l'Homme, les cDC BDCA3⁺ (homologues aux cDC CD103⁺ et CD8⁺ murines) et les LC ont montré une plus grande capacité à polariser des réponses CTL que les autres sous populations de DC (figure 7) (Haniffa *et al.*, 2012; Klechevsky *et al.*, 2008; Segura *et al.*, 2012).

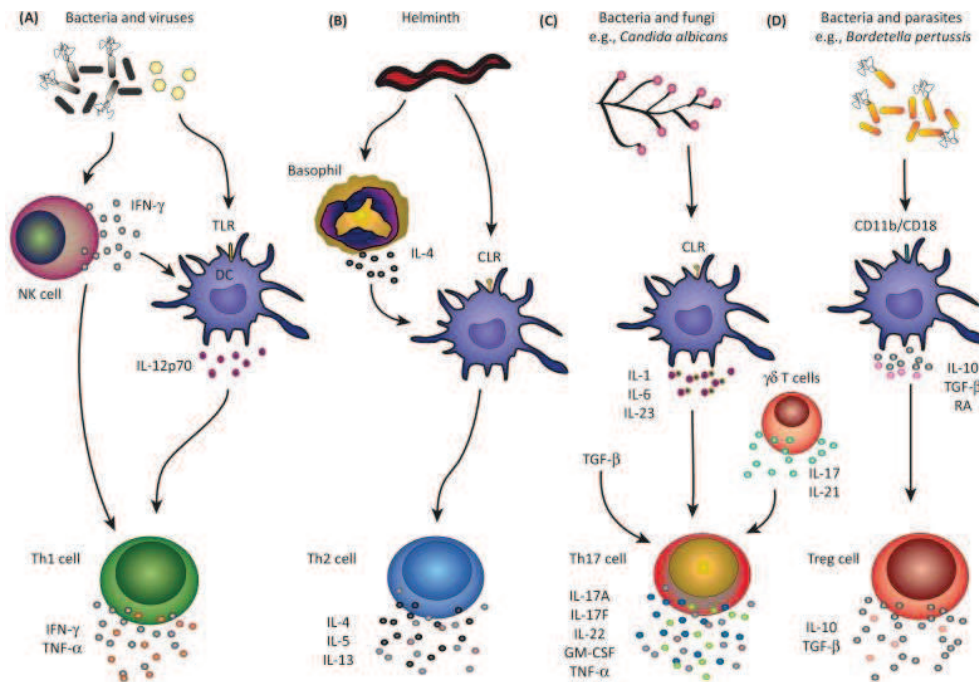


Figure 6 : L'induction de sous populations de T effecteurs par différents signaux médiés par les cDC. (A) La polarisation Th1 se fait par la sécrétion d'IL-12 par les cDC suite à la reconnaissance de bactéries et de virus par l'intermédiaire de TLR et est amplifiée par la sécrétion d'IFN-γ par les NK. (B) La polarisation Th2 est induite en réponse à une activation par des helminthes ou des allergènes des cDC, qui vont produire de l'IL-4. (C) Les CLR de type dectin-1 et dectin-2 sur les cDC vont permettre la reconnaissance bactérienne et fongique, et activer la production d'IL-6 qui en présence de TGF-β va induire une polarisation Th17. (D) La production de TGF-β en absence d'IL-6 par les cDC va conduire à une polarisation Treg, productrice de cytokines régulatrices telles que l'IL-10 et le TGF-β. (D'après (Walsh and Mills, 2013)).

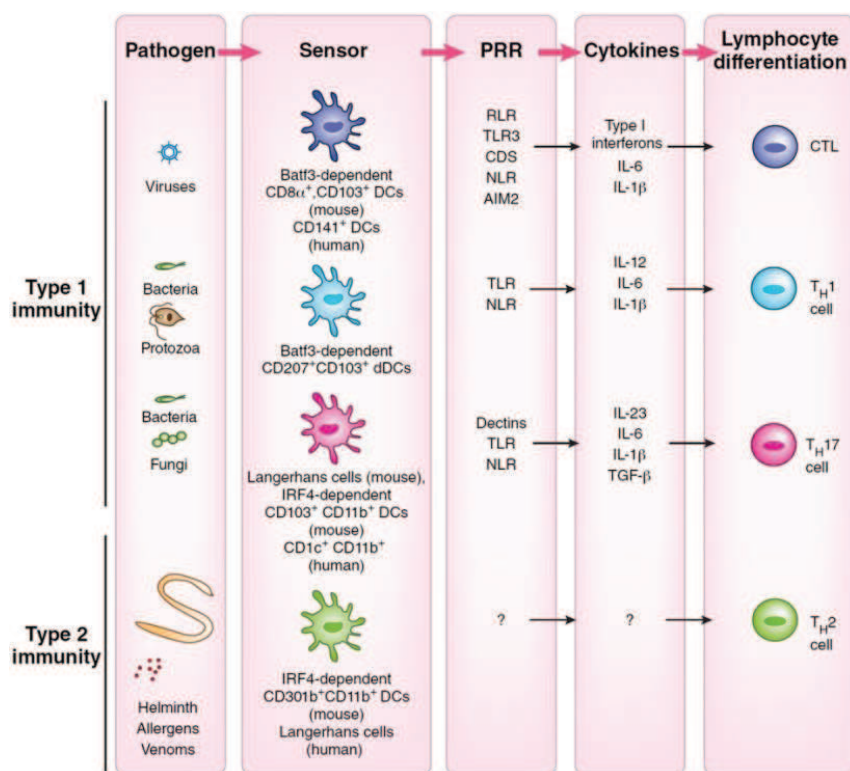


Figure 7 : Polarisation des LT effecteurs par les différentes sous populations de cDC. Les cDC murines CD8 $^+$ et CD103 $^+$ et les cDC humaines BDCA3 $^+$ (CD141 $^+$) vont permettre une différenciation en CTL en réponse aux virus. Les cDC dermales migratoires CD103 $^+$ et lymphoïdes CD8 $^+$ vont être responsables de la polarisation Th1 en réponse aux bactéries et aux protozoaires. Les cDC intestinales CD103 $^+$ CD11b $^+$ et les LC murines, ainsi que les cDC BDCA1 $^+$ (CD1c $^+$) humaines vont permettre une polarisation Th17 en réponse aux bactéries et aux champignons. Enfin les cDC murines CD11b $^+$ et les LC humaines vont être les principales DC responsables de la réponse Th2 contre les helminthes et les allergènes. (D'après (Iwasaki and Medzhitov, 2015)).

Les cDC sont donc capables de générer un large panel de réponses adaptatives pour lutter contre les agressions rencontrées par l'organisme, en polarisant les LT en différentes sous populations inflammatoires. Cependant ces cellules ne vont pas se limiter à intervenir dans la mise en place de réponses inflammatoires, elles vont aussi être primordiales dans l'initiation des mécanismes de tolérance, et plus précisément dans la polarisation des effecteurs permettant cette tolérance, les lymphocytes T régulateurs (Treg).

2.4 Polarisation et mécanismes d'action des Treg dans le maintien de la tolérance

Les Treg sont des cellules avec une activité suppressive permettant le contrôle des réponses T effectrices. Les Treg peuvent être classés en deux catégories. D'une part il existe les Treg dits naturels (nTreg) qui sont produits au niveau du thymus en condition physiologique et expriment le facteur de transcription *Forkhead box P3* (FoxP3). Ces nTreg vont reconnaître les antigènes du soi et permettre d'éviter le développement de réponses immunitaires dirigées contre son propre organisme. D'autre part il existe les Treg dits induits (iTreg) issus de la polarisation de LT CD4 $^+$ naïfs en périphérie. Parmi les iTreg

deux sous populations distinctes sont décrites : les Th3 vont être caractérisés par la sécrétion de TGF- β et comme les nTreg exprimer FoxP3, tandis que les Tr1 ne vont pas exprimer FoxP3 et vont plutôt produire de l'IL-10 (Sakaguchi et al., 2008). La génération de ces différents types de Treg va pouvoir se faire grâce notamment à l'intervention des cDC, qui vont participer à la polarisation de ces effecteurs tolérogéniques. Il a donc été montré que les cDC au niveau du thymus participaient à la différenciation des nTreg (Watanabe et al., 2005). Les cDC vont également permettre la polarisation des iTreg en périphérie. En effet la génération de ces iTreg, les Th3 FoxP3⁺ en particulier, est dépendante de certains facteurs comme le TGF- β et l'acide rétinoïque (Benson et al., 2007; Chen et al., 2003), qui sont apportés par une sous population de cDC CD103⁺ présente au niveau des ganglions mésentériques vers la muqueuse intestinale (Coombes et al., 2007). Les cDC ne se limitent donc pas à l'orientation de réponses adaptatives inflammatoires, elles peuvent aussi intervenir dans la mise en place de réponses tolérogènes centrales et périphériques, en polarisant respectivement des LT naïfs en nTreg et en iTreg.

Cette induction de Treg va permettre le maintien d'un état de tolérance en contrôlant les réponses inflammatoires effectrices. Le mode d'action des Treg leur conférant leurs propriétés suppressives va passer par plusieurs mécanismes, comme la sécrétion de cytokines immunosuppressives, la cytolysse des LT effecteurs et des CPA, la perturbation métabolique et l'altération des fonctions des cellules dendritiques. Ces mécanismes sont présentés plus en détails dans la figure 8.

Les cDC sont donc à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ce sont elles qui vont permettre une activation et une spécialisation efficace des LT pour fournir une réponse adaptée aux différents types d'agressions rencontrées par l'organisme. Il existe un autre type de cellules dendritiques, les pDC, qui vont jouer un rôle spécial au sein des réponses immunitaires. Les pDC comme les cDC sont à la fois impliquées dans des mécanismes innés, mais elles sont aussi capables d'orienter les réponses adaptatives.

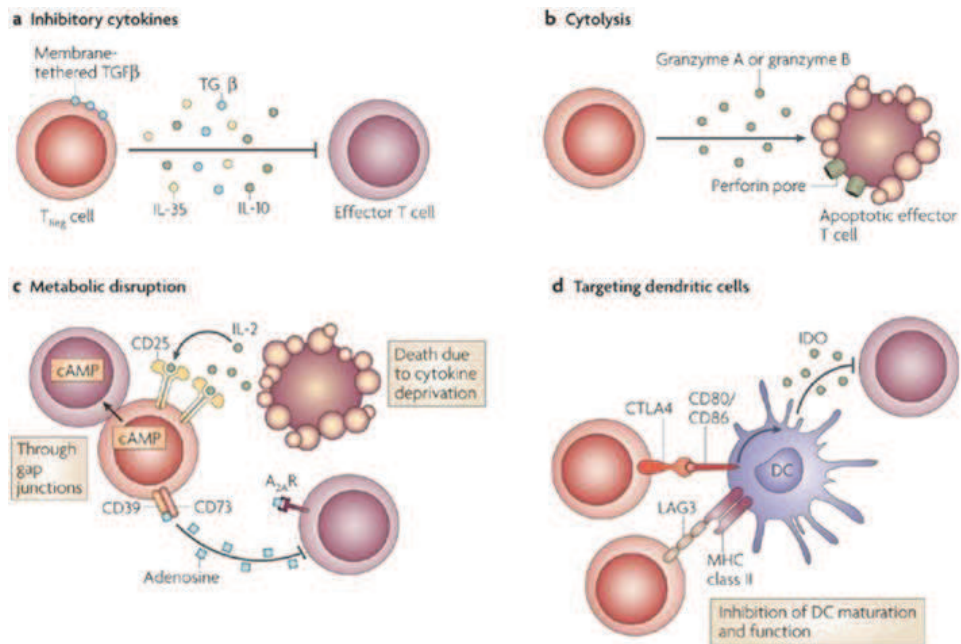


Figure 8 : Mécanisme d'action des populations LT régulatrices. **a)** Les Tr1 vont inhiber les LT effecteurs par la sécrétion de d'IL-10, tandis que les Treg FoxP3⁺ vont principalement sécréter du TGF- β et de l'IL35 deux cytokines aux propriétés suppressives. L'IL-35 moins connue que le TGF- β est composée de deux sous unité IL-12p35 et IL-27 de la famille de l'IL-12 qui se dimérisent pour acquérir des fonctions suppressives (Collison et al., 2007). **b)** Les Treg possèdent le système perforine/granzyme permettant la cytolysse des LT effecteurs, mais aussi des cDC activatrices (Boissonnas et al., 2010). **c)** Les Treg vont également causer un désordre métabolique de différentes manières. Tout d'abord en appauvrissant l'environnement en facteurs activateurs des LT effecteurs comme l'IL-2 *via* le CD25. Ensuite en catabolisant l'ATP en adénosine *via* CD39/CD73 qui va se fixer sur le récepteur A_{2A} à la surface des LT effecteurs et les inhiber. Enfin, les Treg par la production de cAMP vont également inhiber les réponses LT. **d)** Les Treg vont fournir aux cDC des signaux de costimulation inhibiteurs, notamment par CTLA-4 et LAG-3. Le signal fourni par CTLA-4 va notamment induire la sécrétion d'indoléamine-2, 3 -déoxgénase (IDO) par les cDC. Cette enzyme permet le catabolisme du tryptophane nécessaire à la prolifération des LT effecteurs activés. LAG-3 va se lier au CMH-II sur les cDC et inhiber leur maturation (Vignali et al., 2008).

II- Rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans la réponse inflammatoire

En l'absence d'inflammation, les pDC sont des cellules résidentes retrouvées principalement au niveau des organes lymphoïdes. Elles se développent au niveau de la MO et migrent ensuite vers le thymus et les organes lymphoïdes secondaires où elles jouent le rôle de sentinelles. Ces cellules ont été identifiées chez l'Homme en 1997, date à laquelle elles obtiennent leur nom (Grouard *et al.*, 1997). Chez la souris, elles ont été identifiées en 2001 par trois équipes différentes caractérisant leur phénotype (Asselin-Paturel *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2002; Nakano *et al.*, 2001). Cependant, avant même d'être précisément caractérisées, les pDC ont été identifiées par des pathologistes qui observaient des cellules de taille moyenne, dépourvues de dendrites, et avec un réticulum endoplasmique abondant, s'accumuler dans la zone contenant les LT dans les ganglions drainants de patients atteints de cancers (Muller-Hermelink *et al.*, 1983). La présence de ces cellules avec une morphologie comparable aux plasmocytes dans cette zone des ganglions, a conduit ces chercheurs à proposer la dénomination de lymphocytes T plasmacytoïdes pour se référer aux pDC. Elles sont maintenant connues pour être les principales cellules sécrétrices des IFN-I en réponse aux infections virales (Cella *et al.*, 1999; Siegal *et al.*, 1999). Les pDC murines, en particulier, seront traitées dans la suite du document.

1. Phénotype des cellules dendritiques plasmacytoïdes murines

Tout d'abord les pDC n'expriment pas les marqueurs spécifiques des LT, des LB et des cellules myéloïdes. Ce sont donc des cellules $CD3^-CD19^-CD11b^-$ (Hochrein *et al.*, 2002). Initialement, les pDC ont été décrites comme des cellules exprimant à leur surface B220, Gr-1 et CD11c (Asselin-Paturel *et al.*, 2001; Ferrero *et al.*, 2002; Nakano *et al.*, 2001). Ces marqueurs ne sont cependant pas très spécifiques. L'antigène B220 notamment est aussi fortement exprimé à la surface des LB et sur les NK $CD11c^+NK1.1^+$ (Blasius *et al.*, 2007). L'antigène Gr-1 n'est lui exprimé que par certaines souches de souris ; ainsi les pDC de souris BALB/c et Sv129 vont exprimer Gr-1, contrairement à celles de souris C57Bl/6 (Hochrein *et al.*, 2002). L'antigène CD11c est lui un marqueur spécifique des DC, exprimé fortement par les cDC et de façon intermédiaire par les pDC (Asselin-Paturel *et al.*, 2001; Asselin-Paturel *et al.*, 2003). Depuis, des marqueurs plus spécifiques des pDC ont été décrits. L'antigène BST-2 (pour *bone-marrow stroma cell antigen-2*), aussi appelé tetherin ou CD317, est spécifiquement exprimé par les pDC en condition physiologique, mais peut aussi être induit sur d'autres types cellulaires dans des conditions inflammatoires (Asselin-Paturel *et al.*, 2003; Blasius *et al.*, 2006b). BST-2 est reconnu par différents clones d'anticorps tels que le clone 120G8 (Asselin-Paturel *et al.*, 2003) et mPDCA-1 (Krug *et al.*, 2004a). BST-2 est impliqué dans la réponse des pDC contre les virus à enveloppe comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Evans *et al.*, 2010). En effet, BST-2 est une molécule importante pour la production des IFN-I, ainsi que pour la génération de LT $CD8^+$ spécifiques lors d'infections par des rétrovirus (Swiecki *et al.*, 2012). La molécule Ly-49Q, un récepteur de type lectine C, est également présente spécifiquement à la surface de certaines pDC et son expression dépend du degré de maturité des pDC. Ainsi les pDC exprimant

Ly-49Q sont matures et vont être retrouvées uniquement en périphérie, tandis que les pDC Ly-49Q⁻ sont immatures et vont être retrouvées dans la MO. Les pDC matures Ly-49Q⁺ sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF en réponse à une stimulation virale, (Kamogawa-Schifter *et al.*, 2005). Enfin, l'antigène Siglec-H (pour *sialic acid-binding immunoglobulin like lectin-H*) est également exprimé de façon spécifique par les pDC (Blasius *et al.*, 2006a). Siglec-H fonctionne comme un récepteur d'endocytose, permettant une captation et une internalisation efficaces de l'antigène qui va activer les voies TLR contrôlant la sécrétion d'IFN-I (Blasius *et al.*, 2006a; Zhang *et al.*, 2006). La caractérisation des pDC a donc permis de définir leur phénotype CD3⁻CD19⁻NK1.1⁻CD11^{int}B220⁺mPDCA1⁺Siglec-H⁺.

2. Fonctions des pDC dans l'immunité innée

La principale fonction des pDC est la défense contre les infections virales et bactériennes grâce aux propriétés antimicrobiennes des IFN-I fortement produits par les pDC. Les pDC doivent d'abord être activées, notamment grâce au système de reconnaissance des signaux de danger par les PRRs. Les pDC expriment plusieurs types de PRRs au niveau cytosolique comme les hélicases DHX9 et DHX36, capables de reconnaître les ADN viraux (Kim *et al.*, 2010), ainsi que RIG-1, inducible dans les pDC et permettant de détecter les ARN viraux (Szabo *et al.*, 2014). Cependant, les TLR7 et TLR9 restent les PRRs principalement exprimés et permettant une réponse aux ADN et ARN microbiens ainsi qu'aux acides nucléiques libérés par des cellules mourantes en conditions pathologiques.

2.1 Voies de signalisation des TLR7 et TLR9 dans les pDC

Comme décrit précédemment les TLR7 et TLR9 vont reconnaître respectivement les ARN simple brin viraux (Hemmi *et al.*, 2002), et les ADN viraux riches en dinucléotides CpG non/hypo-méthylés, appelés motifs CpG (Krug *et al.*, 2004a; Krug *et al.*, 2004b; Lund *et al.*, 2003). Ces TLR sont exprimés au niveau des endosomes au moment où ils vont reconnaître leurs ligands (Colonna *et al.*, 2004). Par la suite, l'acidification des endosomes par leur fusion avec le lysosome sera nécessaire pour fournir une réponse adaptée aux acides nucléiques microbiens (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002; Diebold *et al.*, 2004). Une fois la liaison entre les TLR7 et TLR9 établie, une cascade de signalisation cellulaire va provoquer l'activation de différentes voies de transduction cellulaire conduisant d'une part à la maturation des pDC, et d'autre part à la production de différentes cytokines. Cette cascade de signalisation va d'abord passer par la protéine adaptatrice MyD88, et selon la localisation et le degré de maturité de l'endosome, l'activation TLR7/9 va induire différentes réponses (figure 9). Ainsi dans l'endosome précoce issu de la fusion des vésicules d'endocytose, l'activation de TLR7/9 va engager la protéine adaptatrice MyD88, provoquant la formation d'un signalosome comprenant TRAF3, TRAF6, IRAK1 et IRAK4. Ce signalosome va par l'intermédiaire de la kinase IKK α , et de la PI3 kinase (PI3K) mener à la phosphorylation du facteur de transcription IRF7, qui va alors induire dans le noyau la production d'IFN-I (Bao and Liu, 2013; Honda *et al.*, 2005; Kawai *et al.*, 2004). La fusion de vésicules lysosomales primaires provenant de l'appareil de Golgi, avec les

endosomes précoces va provoquer l'acidification de ce compartiment, et former les endosomes tardifs. Dans ces derniers, l'engagement de MyD88 va induire le recrutement de TRAF6 et IRAK4 qui vont activer NF- κ B et la MAP kinase p38 (p38MAPK). Ces facteurs de transcription vont alors induire la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF, et l'expression de molécules de co-stimulation comme CD40, CD80 et CD86 (Bao and Liu, 2013; Karrich *et al.*, 2014).

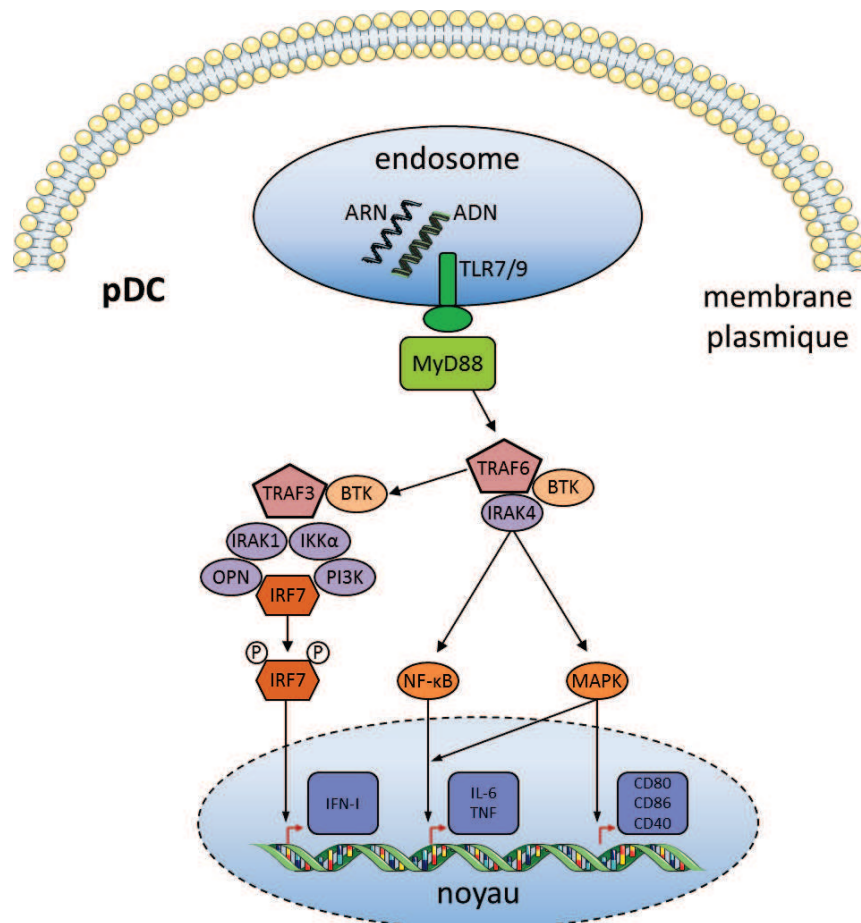


Figure 9 : Signalisation cellulaire suite à l'activation des TLR7 et TLR9. La reconnaissance par les pDC d'acides nucléiques dérivés de pathogènes ou endogènes va activer différentes voies de signalisation. Tout d'abord la protéine adaptatrice MyD88 va être activée et induire différentes cascades. Le recrutement d'un complexe de signalisation comprenant TRAF3, TRAF6, IRAK1, IRAK4 et IKK α va permettre la phosphorylation d'IRF7 par la PI3 kinase (PI3K). La molécule IRF7 phosphorylée va entrer dans le noyau et induire la production d'IFN-I. La molécule MyD88 peut également activer NF- κ B et MAPK par l'intermédiaire du complexe TRAF, IRAK4 et BTK, afin d'induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF, et de déclencher la maturation des pDC par l'expression de molécules de co-stimulation telles que CD40, CD80 et CD86.

2.2 Fonctions des IFN de type I

Historiquement, avant d'être clairement identifiées, les pDC étaient désignées comme des cellules productrices des IFN-I (ou IPC pour *type 1 IFN-producing cells*). Il a été en effet observé que les IPC étaient capables de sécréter 100 à 1000 fois plus d'IFN-I que d'autres types cellulaires en réponse à une

stimulation virale (Asselin-Paturel *et al.*, 2001; Cella *et al.*, 1999). Les pDC sont donc les cellules professionnelles dans la production des IFN-I. À ce jour, on dénombre 16 sous-types d'IFN-I chez l'Homme parmi lesquels l'IFN- α , l'IFN- β , l'IFN- ϵ , l'IFN- κ , l'IFN- τ et l'IFN- ω . Cependant les principaux IFN-I produits, sont l'IFN- α et l'IFN- β . L'IFN- α est produit par certains leucocytes et majoritairement par les pDC, et l'IFN- β par les fibroblastes. Les IFN- α/β vont avoir plusieurs actions dans la lutte antimicrobienne. Tout d'abord, ils vont avoir un effet antiviral direct. Ensuite, ils vont agir sur plusieurs types de cellules du système immunitaires en les activant pour les aider à répondre à l'agression. Il existe un seul récepteur aux IFN-I, le récepteur IFNAR (de Weerd *et al.*, 2007).

2.2.1 Voies de signalisation d'IFNAR

Le récepteur IFNAR est composé de deux sous-unités IFNAR1 et IFNAR2, et est exprimé par la plupart des cellules (de Weerd *et al.*, 2007). Ceci va permettre aux IFN-I d'avoir un champ d'action très large. Ce récepteur est associé à la tyrosine kinase TYK2 qui va le stabiliser et ainsi assurer la liaison des IFN-I et aussi participer à la transduction du signal (Yan *et al.*, 1996). Ne possédant pas d'activité tyrosine kinase, IFNAR est associé à des kinases de la famille Janus (JAKs). Ces molécules JAKs vont assurer avec l'aide de TYK2 la phosphorylation des molécules STAT1 et STAT2, qui vont alors se complexer en homodimères et en hétérodimères (de Weerd *et al.*, 2007). Les dimères STAT vont alors migrer vers le noyau et s'associer à la molécule IRF9 pour former le facteur de transcription ISGF3 (pour *interferon stimulated gene factor 3*) (Hervas-Stubbs *et al.*, 2011). Ce facteur de transcription va se lier à des domaines de réponse à l'IFN-I et induire la transcription de gènes présentant des fonctions diverses, dont une action antivirale.

2.2.2 Action antivirale directe des IFN-I

L'activation d'IFNAR va donc induire la transcription des ISG (pour *interferon stimulated gene*) dont certains vont avoir une fonction antivirale. La première protéine à activité antivirale est la protéine kinase dépendante des ARN double brin, PKR (Clemens and Elia, 1997). Ensuite, la protéine kinase à sérine thréonine PKC peut s'activer par autophosphorylation et provoquer la phosphorylation de plusieurs substrats (Samuel, 2001). Ceci aura pour conséquence l'inhibition de la traduction et de la réplication virale dans les cellules infectées (Meurs *et al.*, 1992; Muto *et al.*, 1999). Le système 2'-5' oligoadénylate synthétase et RNaseL (OAS/RNaseL) va également jouer un rôle anti-viral grâce à son activité RNase. Cette activité déclenchée lors d'une infection virale (Samuel, 2001) permet la dégradation des ARN cellulaires et viraux, empêchant ainsi la propagation de l'infection (Zhou *et al.*, 1997). Enfin, les protéines de la famille Mx, comme MxA et Mx1, sont également décrites et possèdent une fonction antivirale. Ces protéines sont des GTPases qui vont s'associer entre elles et former des complexes avec les protéines virales, mais leur mode d'action dépend du virus rencontré (Samuel, 2001). Néanmoins il a été clairement montré que ces protéines Mx étaient centrales dans l'inhibition de la réplication virale (Haller *et al.*, 1998).

2.2.3 Action de l'IFN- α/β sur les cellules immunitaires

Directement *via* l'IFNAR ou indirectement par la production d'autres cytokines et chémokines, l'IFN- α/β va augmenter la capacité de certains types cellulaires à répondre aux infections. En premier lieu, l'IFN- α/β est capable d'augmenter l'expression du CMH-I à la surface des cellules infectées, ce qui va les rendre plus sensibles à l'action des CTL (Garofalo *et al.*, 1996). Cette régulation positive du CMH-I par l'IFN- α/β ne se limite pas aux cellules infectées, mais touche aussi les cDC. En effet, des expériences *in vitro* ont montré que la stimulation de cDC par l'IFN- α/β permettait leur maturation en induisant l'expression du CMH-I et CMH-II, de CD80, CD86, CD40 et de CD83 (Montoya *et al.*, 2002). Ceci va naturellement augmenter la capacité des cDC à présenter l'antigène et à activer la réponse adaptative. Plus particulièrement, des études ont montré que l'IFN- α/β augmentait la capacité de présentation croisée des cDC aux LT CD8⁺ (Le Bon *et al.*, 2003). Enfin, l'IFN- α/β en faible concentration est aussi capable d'augmenter la sécrétion d'IL-12p70 par des DC dérivées de monocytes (Gautier *et al.*, 2005). L'IFN- α/β a donc une action directe importante sur les cDC. De plus, l'IFN- α/β est capable d'augmenter l'expression de CCR7 à la surface des cDC, et ainsi favoriser l'immunité adaptative en facilitant la migration des cDC au niveau des ganglions où la présentation antigénique a lieu (Parlato *et al.*, 2001). Très tôt, l'IFN- α/β a aussi été impliqué dans la régulation des NK en augmentant leur capacité cytotoxique (Trinchieri and Santoli, 1978). L'axe IFN- α/β /STAT1 a ainsi été identifié comme directement nécessaire aux NK pour fournir une réponse cytotoxique (Lee *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2002). De plus, l'activation de STAT1 par l'IFN- α/β participe indirectement à la survie et à la prolifération des NK par la production d'IL-15 (Nguyen *et al.*, 2002). Des études *in vivo* ont d'ailleurs montré que des souris infectées par différents virus comme le MCMV (Dalod *et al.*, 2003) ou le virus de la vaccine (VV) (Martinez *et al.*, 2008) présentaient une réponse cytotoxique NK dépendante de l'IFN- α/β . Ceci a également été montré chez l'Homme dans des expériences *in vitro* où des pDC stimulées par le virus de la grippe sont capables d'activer les fonctions cytotoxiques des NK grâce à leur production d'IFN- α/β (Gerosa *et al.*, 2005). Si la production des IFN-I par les pDC permet d'augmenter les fonctions d'un grand nombre de cellules innées, ces cellules jouent également un rôle important dans la mise place de la réponse adaptative.

3. Fonctions des pDC dans l'immunité adaptative

Les réponses adaptatives vont concerner la mise en place de réponses cellulaires effectrices spécifiques de l'antigène. Ces effecteurs vont être en grande partie des LT qui vont pouvoir se polariser en plusieurs sous types avec des caractéristiques fonctionnelles propres. Comme décrit précédemment, ce sont les CPA, et plus précisément les cDC qui vont participer à l'activation et à la polarisation des LT. Cependant si les cDC sont considérées comme des CPA professionnelles, les pDC ont également le potentiel d'activer et de polariser la réponse des LT. En effet, les pDC peuvent présenter l'antigène et moduler grâce à leur sécrétome le microenvironnement de la présentation antigénique.

3.1 Capacité de présentation de l'antigène des pDC

La capacité des pDC à présenter l'antigène pour induire une réponse LT reste à ce jour discuté. Cependant, un certain nombre d'évidences montre que les pDC sont capables de présenter l'antigène aux LT. Tout d'abord, les pDC expriment à la fois le CMH-I et le CMH-II ce qui leur confère le potentiel de présentation antigénique (Villadangos and Young, 2008). Il leur faut ensuite pouvoir capter, préparer et apprêter l'antigène pour qu'il puisse être présenté à leur surface par les molécules du CMH. Cette préparation des antigènes a lieu dans le cytosol pour les peptides présentés par le CMH-I, et dans les endosomes pour les peptides présentés par le CMH-II. Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont ainsi montré que les pDC pouvaient présenter des antigènes d'origine endogène soit exprimés constitutivement (Krug *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2008), soit dérivés de virus infectant les pDC (Fonteneau *et al.*, 2003; Salio *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2008). Les pDC ne sont par contre pas très efficaces dans la présentation d'antigènes exogènes. Ceci est dû au fait que la préparation de peptides d'origine exogène nécessite l'internalisation des antigènes. Les cDC utilisent plusieurs mécanismes pour intégrer l'antigène comme la macropinocytose, la phagocytose ou encore l'endocytose dépendante de récepteurs, ce qui les rend très efficaces dans cette tâche. En revanche, les pDC ont une très faible activité de macropinocytose. Par exemple, les pDC ne sont capables que d'internaliser une faible quantité de FITC-dextran (Ito *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 1999). De même les pDC ont une très faible activité de phagocytose de cellules mortes, ou encore de zymosan ou de composés synthétiques (Dalgaard *et al.*, 2005; Grouard *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1999). En revanche il a été montré que les pDC peuvent internaliser des microparticules, de petites vésicules (0,1-1 μm) produites par les cellules activées, en situation de stress, ou mourantes. L'internalisation de ces microparticules provoque l'activation des pDC qui augmentent l'expression de marqueurs de maturations CD80, CD83 et CD40, mais aussi du CMH-II à leur surface, ainsi que la sécrétion de cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-8. Dans ce contexte les pDC vont être capables d'induire la prolifération de LT CD4⁺ et de les faire sécréter des cytokines de type Th1 comme l'IFN- γ et le TNF (Angelot *et al.*, 2009). Les microparticules contenant une partie du cytoplasme cellulaire potentiellement constitué d'antigènes, leur internalisation pourrait être un vecteur à la présentation antigénique. Les pDC peuvent également faire de l'endocytose par l'intermédiaire de récepteurs aux antigènes. C'est par exemple le cas dans la présentation d'antigènes viraux, où l'expression par les pDC de l'antigène CD4 va permettre l'internalisation de l'enveloppe virale glycoprotéique du VIH, et induire une activation des LT CD4⁺ spécifiques (Sandgren *et al.*, 2013). D'autres récepteurs à la surface des pDC ont été décrits pour l'internalisation d'antigènes comme Siglec-H (Zhang *et al.*, 2006), BST-2 (Neil *et al.*, 2008), DCIR (Meyer-Wentrup *et al.*, 2008), BDCA2 (Dzionek *et al.*, 2001) ou encore le Fc γ -RIIa (Benitez-Ribas *et al.*, 2006). Ainsi l'arsenal de récepteurs présents à la surface des pDC pour leur permettre de lutter contre les infections, va aussi servir à la présentation antigénique. Au final, ce qui différencie le plus les cDC des pDC dans leur capacité à présenter l'antigène et de mettre en place des réponses adaptatives efficaces, est le renouvellement des molécules du CMH-II à leur surface. En effet, les cDC au stade immature vont

exprimer un nombre constant de molécules de CMH-II en surface à cause d'un renouvellement constant. La capture antigénique va conduire les cDC à maturer et à présenter l'antigène, et ce faisant elles vont perdre cette capacité de renouvellement du CMH-II, ce qui va provoquer le maintien des molécules du CMH-II présentant l'antigène en surface et permettre une activation prolongée des LT naïfs (Villadangos and Young, 2008). Au contraire les pDC quand elles sont activées ne stoppent pas ce renouvellement du CMH-II (Young *et al.*, 2008), ce qui limite leur capacité à induire des réponses adaptatives aussi fortement que les cDC.

Les pDC sont également capables de réaliser la présentation croisée des antigènes, qui consiste à utiliser le CMH-I pour activer une réponse LT CD8⁺. Ainsi différentes études ont montré que les pDC sanguines humaines pouvaient faire de la présentation croisée des antigènes viraux issus du VIH (Hoeffel *et al.*, 2007), ou du virus de la grippe (Di Pucchio *et al.*, 2008; Lui *et al.*, 2009). En plus des antigènes viraux, les pDC sont également capables de présenter efficacement des antigènes tumoraux aux LT CD8⁺ (Tel *et al.*, 2013). Chez la souris, il semble qu'une stimulation des TLR par leurs ligands, notamment CpG/TLR9, permet la présentation croisée d'antigènes exogènes (de Brito *et al.*, 2011; Kool *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2015). Cependant, toutes ces études utilisent des modèles différents et *in vitro* uniquement. Ceci donne lieu à des résultats contradictoires et la capacité de présentation croisée des pDC est encore largement discutée. Une hypothèse voudrait que les pDC puissent présenter l'antigène aux LT CD4⁺ et CD8⁺ en fonction du type de signal qu'elles reçoivent par l'intermédiaire de tous les récepteurs qu'elles expriment (Villadangos and Young, 2008).

3.2 Orientation de la réponse LT par les pDC

À l'image des cDC, les pDC peuvent orienter la réponse adaptative, et déterminer la polarisation des LT effecteurs. En effet, chez des souris totalement déficientes en pDC grâce au blocage spécifique du facteur de transcription E2-2, nécessaire au développement des pDC, il a été montré un déficit des réponses LT CD4⁺ et CD8⁺ antivirales spécifiques (Cervantes-Barragan *et al.*, 2012).

3.2.1 Polarisation des LT CD4⁺ naïfs par les pDC

Il a été montré par différents travaux que les pDC étaient capables de polariser des LT CD4⁺ naïfs en presque tous les types de LT effecteurs décrits. L'orientation de la réponse vers un sous-type de LT effecteur ou un autre va dépendre de la stimulation reçue par les pDC et donc du sécrétome qu'elles vont produire. En effet, une stimulation des pDC murines ou humaines par du CpG va favoriser une polarisation de type Th1. Ceci est appuyé par le fait qu'une stimulation couplée des TLR et du récepteur CD40 va induire la production d'IL12p70 par les pDC, et donc une polarisation Th1 (Krug *et al.*, 2001). L'inactivation de l'IL-12 sur des pDC stimulées par CpG ou par des virus inhibera au contraire la polarisation Th1 (Boonstra *et al.*, 2003; Cella *et al.*, 2000). De plus, les IFN-I jouent également un rôle dans la polarisation Th1 par les pDC (Cella *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2004). Si ce signal par les IFN-I est bloqué, la polarisation des LT vers un profil Th2 par les pDC va être favorisée au détriment d'une

polarisation Th1. D'autres récepteurs à la surface des pDC comme BST-2 vont également favoriser la polarisation Th1 s'ils sont impliqués lors de l'internalisation de l'antigène, en complément d'une stimulation TLR (Loschko *et al.*, 2011). Il a également été montré que la simple coculture de pDC et de LT issus de souris OTII-Rag^{-/-} possédant uniquement des LT spécifiques de l'OVA, va permettre une polarisation vers un profil Th1 en présence d'un peptide issu d'OVA (Bonnefoy *et al.*, 2011a). À l'inverse, d'autres signaux comme celui apporté par l'IL-3 vont favoriser la polarisation des LT par les pDC vers un profil Th2 (Ito *et al.*, 2004; Kadowaki *et al.*, 2000). De plus, la polarisation Th2 par les pDC est augmentée par l'expression dépendante du signal CD40 ligand (CD40L), de la molécule OX40L à leur surface (Ito *et al.*, 2004). Enfin si les pDC peuvent polariser les LT CD4⁺ en Th1 ou en Th2, elles peuvent aussi orienter la polarisation de LT CD4⁺ naïfs vers le profil Th17. En effet, la stimulation des pDC par le TLR7 va induire une polarisation Th17 dépendante des cytokines IL-1β et IL-23 alors sécrétées par les pDC (Yu *et al.*, 2010). Deux autres cytokines sont essentielles pour la différenciation Th17, l'IL-6 et le TGF-β. Une étude a d'ailleurs montré que des pDC traitées au TGF-β étaient capables de sécréter du TGF-β. En combinaison avec l'IL-6, généralement produite à bas bruit par les pDC ou en quantité plus importante en réponse à des ligands de TLR, type CpG, le TGF-β favorise une polarisation Th17 (Bonnefoy *et al.*, 2011a). Cette capacité des pDC à induire des Th17 a d'ailleurs une incidence dans différentes pathologies auto-immunes qui seront traitées par la suite.

Toutefois les pDC ne se limitent pas à induire des réponses inflammatoires, elles sont aussi capables de favoriser des fonctions régulatrices en activant des LT suppresseurs. En effet, les pDC peuvent aussi bien provoquer un état anergique chez les LT *in vivo* dans un contexte tumoral (Munn *et al.*, 2004), qu'induire une polarisation de Treg spécifiques d'une stimulation antigénique *in vitro* (Martin *et al.*, 2002). Plus récemment le potentiel des pDC à polariser les LT en sous populations régulatrices a été largement étudié. Ainsi il a été montré que les pDC pouvaient favoriser la polarisation de LT producteurs d'IL-10 au profil Tr1 (Ito *et al.*, 2007). Certains microenvironnements, comme la présence de TGF-β en absence d'IL-6 vont favoriser une polarisation des LT naïfs en Treg par les pDC (Bonnefoy *et al.*, 2011b; Volpi *et al.*, 2012). Les mécanismes permettant l'induction de populations Treg vont être dépendants de plusieurs signaux passant notamment par la molécule de costimulation ICOSL (Conrad *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2007), ou encore par l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Chen *et al.*, 2008b; Volpi *et al.*, 2012) et seront détaillés plus loin dans l'introduction. En plus de favoriser la polarisation des iTreg, les pDC sont impliquées dans la différenciation et l'expansion des nTreg au niveau du thymus (Hanabuchi *et al.*, 2010; Martin-Gayo *et al.*, 2010). Les mécanismes conférant ces fonctions tolérogéniques aux pDC seront d'ailleurs abordés plus en détail par la suite dans l'introduction (voir partie III-3).

3.2.2 Activation des LT CD8⁺ par les pDC

Les pDC ont également la capacité d'activer les fonctions effectrices des LT CD8⁺. En effet, la stimulation *in vitro* des pDC par des antigènes viraux va permettre la prolifération des LT CD8⁺ qui vont alors produire de l'IFN-γ (Di Pucchio *et al.*, 2008; Fonteneau *et al.*, 2003; Hoeffel *et al.*, 2007). Il est

également possible d'induire une réponse anti-tumorale des CTL en chargeant les pDC *in vitro* avec des peptides tumoraux (Salio *et al.*, 2003). Cependant les pDC ont une mauvaise capacité à internaliser les antigènes exogènes, et plus particulièrement, les antigènes tumoraux car elles ne possèdent pas les récepteurs adéquats (Salio *et al.*, 2004). Il a cependant été montré *in vivo* chez la souris que les pDC étaient capables de participer efficacement à la mise en place d'une réponse anti-tumorale CD8⁺ en augmentant les capacités de présentation croisée des cDC (Liu *et al.*, 2008). Ces travaux mettent en évidence l'importance de l'activation des voies TLR des pDC pour permettre une présentation croisée efficace et la mise en place d'une réponse CD8⁺ anti-tumorale. Ainsi, l'utilisation de cellules tumorales infectées par un virus permettra aux pDC de présenter l'antigène aux LT CD8⁺, et ainsi produire une réponse cytotoxique spécifique (Guillermie *et al.*, 2013). En résumé, les pDC étant spécialisées dans la lutte antivirale, il semble que la présentation croisée d'antigènes viraux soit plus aisée que l'internalisation et la présentation d'antigènes exogènes, comme les peptides tumoraux ne pouvant pas se lier spécifiquement aux pDC. Le ciblage de récepteurs des pDC pour permettre la présentation d'antigènes tumoraux semble donc être une bonne stratégie. L'utilisation d'Ac anti-BST-2 couplé à l'OVA en association avec une stimulation TLR, a ainsi permis d'induire chez la souris des réponses CD8⁺ spécifiques contre le virus de la vaccine exprimant l'OVA et contre des cellules tumorales B16-OVA (Loschko *et al.*, 2011). De même le ciblage de Siglec-H par un Ac couplé à l'OVA a également produit une réponse CD8⁺ spécifique efficace *in vivo* contre l'OVA (Zhang *et al.*, 2006).

Au final, les pDC sont donc bien des cellules de l'immunité innée capables d'orienter efficacement les réponses adaptatives vers des profils inflammatoires. Cependant les capacités pro-inflammatoires de ces cellules vont parfois être trop fortes les conduisant à être impliquées dans un certain nombre de pathologies auto-immunes.

4. Implication des pDC dans les pathologies auto-immunes

Les fonctions des pDC dans les réponses inflammatoires sont donc primordiales pour la mise en place de réponses immunitaires innées et adaptatives. L'ensemble des cytokines sécrétées par ces cellules et plus particulièrement les IFN-I, sont indispensables à orienter ces réponses. Cependant, un dérèglement et/ou un défaut de régulation de ces fonctions peut conduire à la survenue de pathologies auto-immunes. Les pDC ont donc été impliquées dans plusieurs pathologies auto-immunes telles que le SLE, le psoriasis, la sclérose en plaques ou encore le diabète de type I.

4.1 Les pDC dans le lupus érythémateux disséminé (SLE)

Le SLE est une pathologie auto-immune à l'étiologie encore mal connue qui implique des facteurs à la fois génétiques et environnementaux. Elle est caractérisée par une perte de tolérance avec pour conséquence la présence de LT et LB auto-réactifs, ainsi qu'une éfferocytose défectueuse. De nombreux auto-anticorps ciblant des antigènes nucléaires sont également retrouvés au niveau sérique, et la formation de complexes immuns va causer des dommages au niveau des reins, de la peau, des articulations et du

système nerveux central (Kim *et al.*, 2015). L'implication des pDC dans la physiopathologie du SLE est maintenant bien établie. En effet, même si moins de pDC circulantes sont retrouvées chez les patients atteints de SLE (Migita *et al.*, 2005), il semble qu'elles migrent dans les organes cibles de la maladie, un important infiltrat de pDC étant retrouvé au niveau des reins et de la peau, en particulier (Farkas *et al.*, 2001; Fiore *et al.*, 2008). L'implication des pDC dans la physiopathologie du SLE a également été montrée chez la souris, où la déplétion des pDC améliore la maladie, en réduisant un grand nombre de symptômes tels que les dommages rénaux, la présence de LT et LB auto-réactifs et d'auto-anticorps (Rowland *et al.*, 2014). L'importance des pDC dans cette pathologie est appuyée par la présence d'IFN-I en forte quantité dans le sérum des patients atteints de SLE (Bengtsson *et al.*, 2000). De plus il existe une corrélation directe entre l'activité de la maladie et soit l'expression du gène de l'IFN- α , soit son taux sérique (Baechler *et al.*, 2003; Dall'era *et al.*, 2005). L'IFN- α produit par les pDC va tout d'abord provoquer la maturation des cDC à l'origine de la forte activation des LT auto-réactifs (Blanco *et al.*, 2001). Ensuite l'IFN- α et l'IL-6 vont favoriser la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'auto-Ac (Jego *et al.*, 2003; Le Bon *et al.*, 2001). Enfin dans le SLE, l'IFN- α pourrait promouvoir une réponse lymphocytaire de type Th17 (Ambrosi *et al.*, 2012), qui, par la production d'IL-17 va induire une commutation de classe des LB importante dans la production d'auto-Ac (Doreau *et al.*, 2009). La forte production des IFN-I par les pDC est provoquée par la stimulation des TLR7/TLR9 par des acides nucléiques du soi, présents au sein des complexes immuns. Ces acides nucléiques du soi vont rentrer dans le compartiment intracellulaire des pDC par l'intermédiaire du Fc γ -RII (Bave *et al.*, 2003; Means *et al.*, 2005), de RAGE liant HMGB1 présent dans les complexes immuns (Tian *et al.*, 2007), et enfin par leur liaison à LL-37, un peptide antimicrobien présent au niveau des NETs et sécrété par les NK (Garcia-Romo *et al.*, 2011; Lande *et al.*, 2011).

4.2 Les pDC dans le psoriasis

Le psoriasis est une pathologie auto-immune assez répandue qui va toucher principalement la peau et est caractérisée par une forte prolifération des kératinocyte. Ce sont les LT auto-réactifs produisant de l'IFN- γ , du TNF et de l'IL-17 qui sont principalement impliqués dans la physiopathologie du psoriasis (Albanesi *et al.*, 2010). Comme dans le SLE, une diminution des pDC circulantes est observée, tandis qu'un infiltrat important est retrouvé au niveau de la peau (Albanesi *et al.*, 2009; Gilliet *et al.*, 2004; Nestle *et al.*, 2005; Wollenberg *et al.*, 2002). Cependant les pDC interviennent plutôt dans la mise en place de la maladie. En effet, l'infiltrat de pDC dans la peau est important au moment du développement de la pathologie, mais très faible quand l'inflammation devient chronique (Albanesi *et al.*, 2010; Albanesi *et al.*, 2009). C'est grâce à la chémokine chemerin qui va se lier au récepteur ChemR23 sur les pDC, que ces cellules vont être recrutées au niveau de la peau (Albanesi *et al.*, 2009). Ceci va de pair avec une sécrétion transitoire et précoce d'IFN- α au cours de la mise en place de la pathologie (Nestle *et al.*, 2005). Cette production d'IFN- α est nécessaire à la physiopathologie du psoriasis, car si cette cytokine est bloquée, le développement de la maladie est inhibé (Nestle *et al.*, 2005). De plus, l'utilisation d'imiquimod, une molécule agoniste du TLR7, pour traiter des infections virales chez des patients atteints de psoriasis, a

conduit à une forte production d'IFN-I associée à l'aggravation de la maladie (Gilliet *et al.*, 2004). Comme dans la physiopathologie du SLE, l'IFN- α va permettre l'activation d'autres cellules immunitaires comme les cDC qui vont à leur tour activer les cellules de l'immunité adaptative (Albanesi and Pastore, 2010). Les mécanismes qui vont conduire des acides nucléiques du soi à activer les voies TLR des pDC restent pour le moment mal décrits. Cependant, la surexpression de LL-37 au niveau des lésions de psoriasis, laisse penser que de l'ADN du soi pourrait être amené dans le compartiment intracellulaire des pDC *via* des mécanismes similaires à ceux décrits dans le SLE (Frohm *et al.*, 1997).

4.3 Les pDC dans la sclérose en plaques (SEP)

La SEP est une maladie chronique inflammatoire du système nerveux central (SNC) caractérisée par une démyélinisation des cellules nerveuses, entraînant des dommages psychiques et moteurs. C'est la présence d'un infiltrat de cellules inflammatoires au niveau du SNC contenant notamment des LT auto-réactifs CD4⁺ et CD8⁺ qui va être en grande partie responsable de cette démyélinisation (Noseworthy *et al.*, 2000). Cependant, en plus des LT auto-réactifs, l'infiltrat de cellules inflammatoires retrouvé dans le liquide cébrospinal (LCS) des patients atteints de SEP, contient une forte proportion de pDC sécrétant des IFN-I en grande quantité (Lande *et al.*, 2008). De plus, une augmentation du nombre de pDC dans le LCS est observée lors des phases inflammatoires de la maladie (Longhini *et al.*, 2011). Contrairement aux autres pathologies auto-immunes présentées jusqu'ici, les pDC dans la SEP jouent à la fois un rôle dans la mise en place de la maladie, et un rôle protecteur. En effet, d'une part dans un modèle expérimental de SEP (modèle EAE pour Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale), les pDC participent au développement de la pathologie de par leur capacité pro-Th17 (Isaksson *et al.*, 2009), car quand elles sont déplétées au moment de l'induction de la maladie, la sévérité de l'EAE est drastiquement diminuée (Isaksson *et al.*, 2009). D'autre part, quand la déplétion des pDC est réalisée quand l'EAE est déclarée, cette approche va augmenter l'activation des LT CD4⁺ et la production d'IL-17 et d'IFN- γ dans le SNC, aggravant ainsi la sévérité de la maladie (Bailey-Bucktrout *et al.*, 2008). Ceci démontre le double jeu des pDC dans le devenir de cette maladie. Le rôle protecteur des pDC semble passer par leur capacité à présenter l'antigène car en l'absence de CMH-II sur les pDC dans un modèle d'EAE, la quantité de LT CD4⁺ pathogéniques va augmenter, la quantité de lymphocytes T régulateurs (Treg) nécessaires au contrôle de la maladie diminuer (Irla *et al.*, 2010). Chez l'Homme, il semble que les pDC peuvent induire une polarisation Th9, et que l'IL-9 interférerait avec les Th17 pour inhiber leur production d'IL-17 (Ruocco *et al.*, 2015). Toujours chez l'Homme, deux sous populations de pDC capables de promouvoir différentes réponses ont été identifiées. La première population de pDC BDCA4⁺CD123^{low} va favoriser la polarisation Th17, tandis que les pDC BDCA4⁺CD123^{high} vont plutôt favoriser la production d'IL-10 par les LT (Schwab *et al.*, 2010). Chez les patient atteints de SEP, une plus grande proportion de pDC BDCA4⁺CD123^{low} est retrouvée par rapport à des donneurs sains, ce qui est corrigé par un traitement par IFN- β (Schwab *et al.*, 2010). Ce traitement par IFN- β a par ailleurs montré son efficacité dans la SEP, notamment en inhibant l'expression de CCR7 à la surface des pDC et leur production d'IFN-I, ainsi qu'en

diminuant la production de plusieurs chémokines telles que CCL3, CCL4 et CCL5 qui sont des agonistes de CCR5, un récepteur activateur des Th1 (Aung *et al.*, 2010).

4.4 Les pDC dans le diabète de type I

Le diabète de type I (T1D) ou insulino-dépendant est une pathologie auto-immune causée par la destruction des cellules β des îlots pancréatiques productrices d'insuline par des LT auto-réactifs. Une étude a montré qu'une augmentation du taux d'IFN- α dans le pancréas pouvait être observée chez des patients atteints de T1D (Huang *et al.*, 1995). De plus, la survenue du T1D est associée avec certaines infections virales comme par le virus ourlien ou de la rubéole, ceci étant lié au fait que les personnes atteintes de T1D présentent un fort taux sérique d'IFN- α (Devendra and Eisenbarth, 2004). Ces observations sont corroborées avec les résultats de plusieurs travaux montrant que des thérapies antivirales contre l'hépatite C utilisant de l'IFN- α augmentent l'incidence du T1D (Bosi *et al.*, 2001; Fabris *et al.*, 2003; Schreuder *et al.*, 2008). Chez des souris NOD (pour non obese diabetes) qui développent de façon spontanée un T1D, le blocage de IFNAR avant la déclaration de la maladie va retarder la survenue du diabète (Li *et al.*, 2008). De plus, l'expression d'un transgène d'IFN- α (Stewart *et al.*, 1993) ou d'IFN- β (Alba *et al.*, 2004) dans les cellules β du pancréas de souris non prédisposées à déclarer un T1D, va induire le développement du diabète avec une destruction des cellules β et un infiltrat inflammatoire au niveau du pancréas. La majorité des IFN- α/β étant produit par les pDC, des travaux ont montré que la déplétion de ces cellules chez des souris NOD prévient la survenue du T1D (Li and McDevitt, 2011). Plus récemment, il a été décrit que des patients atteints de T1D présentent un nombre augmenté de pDC par rapport à des personnes saines (Xia *et al.*, 2014b). Dans cette même étude, la capacité des cellules mononucléées du sang des patients atteints de T1D à produire de l'IFN- α est également plus élevée que celles des patients sains, avec une capacité supérieure à activer une réponse de type Th1. Il a été montré que les mécanismes menant à cette production accrue d'IFN- α par les pDC dans le T1D faisait intervenir une stimulation des voies TLR de ces cellules par de l'ADN du soi (Diana *et al.*, 2013). En effet, chez la souris NOD, la survenue du diabète est dépendante de l'activation des pDC par l'ADN du soi porté par des IgG produits par les LB et un peptide antimicrobien liant l'ADN, CRAMP (analogue au LL-37 humain), produit par les neutrophiles. Ce mécanisme est semblable à celui précédemment décrit dans le développement du SLE et du psoriasis, et montre bien que l'activation des fonctions des pDC par les peptides du soi favorise grandement la survenue de pathologies auto-immunes.

Les pDC sont donc comme les cDC, des cellules à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. L'expression des TLR7 et TLR9 au niveau endosomal va permettre aux pDC de reconnaître les acides nucléiques d'origine virale ou du soi, et de sécréter de fortes quantités d'IFN-I. La sécrétion d'autres cytokines par les pDC en réponse à différents signaux, va aussi les conduire à orienter la réponse adaptative par la polarisation spécifique des LT. Cependant, la dérégulation des mécanismes d'activation des pDC peut conduire comme décrit précédemment, au développement d'un certain nombre de

pathologies auto-immunes. En effet, des mécanismes de contrôle des DC ont été décrits pour éviter la survenue de tels épisodes inflammatoires.

III- Mécanismes de contrôle de la réponse inflammatoire

La spécialisation des pDC étant la lutte antivirale, c'est dans cette situation qu'elles sont le plus souvent activées. Dans ce but, elles sécrètent de l'IFN- α en grande quantité en réponse à la stimulation TLR7 et TLR9 par la voie MyD88-IRF7. Cependant, plusieurs études chez la souris ont montré que le nombre de pDC diminuait dans la rate après une stimulation TLR, ou au cours d'infections par le cytomégalo virus murin (MCMV), ou par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) (Asselin-Paturel *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009; Zuniga *et al.*, 2008). Ce phénomène n'est pas observé au tout début de la maladie et s'installe plutôt au cours du développement de la maladie. Ceci s'accompagne d'une forte sécrétion d'IFN- α dans la première phase de l'infection, qui va ensuite très fortement diminuer, en même temps que le nombre de pDC s'effondre (Lee *et al.*, 2009; Zuniga *et al.*, 2008). Cette absence d'IFN- α dans les phases chroniques de l'infection virale suggère soit que les pDC ne sont plus en état de répondre à une stimulation TLR pour produire de l'IFN- α , soit que les pDC ont été éliminées. Chez l'Homme aussi, le même type de données a été rapporté. Le nombre de pDC circulantes chez les patients atteints d'infections chroniques par les virus de l'hépatite B et C (HBV et HCV) est diminué jusqu'à deux fois, et associé à une baisse de la concentration en IFN- α (Duan *et al.*, 2004; Kanto *et al.*, 2004). Chez des patients atteints par le VIH, une forte charge virale est aussi corrélée avec une perte des pDC (Altfeld *et al.*, 2011; Finke *et al.*, 2004). Chez les personnes atteintes par le VIH, une augmentation des marqueurs d'apoptose sur les pDC a été observée pouvant expliquer la perte de ces cellules (Meera *et al.*, 2010). De plus, cette perte se maintient chez les patients aux stades avancés de la maladie, et pourrait expliquer le déficit des réponses antivirales innées chez ces personnes (Meera *et al.*, 2010).

L'étude de Swiecki *et al.* a permis d'identifier un mécanisme permettant d'expliquer la mort des pDC par apoptose au cours des infections virales. La forte sécrétion autocrine d'IFN- α suite à la stimulation virale va conduire les pDC à produire certaines molécules pro-apoptotiques telles que Bid, Bim et Bax conduisant à leur mort par apoptose (Swiecki *et al.*, 2011). Cette entrée en apoptose des pDC n'étant pas observé chez des souris IFNAR^{-/-} (Swiecki *et al.*, 2011), il a été suggéré que les pDC possèdent un mécanisme de rétrocontrôle négatif dépendant de l'IFN-I (figure 10). Ces données sont confirmées par d'autres travaux qui montrent que des patients infectés par HCV et traités par IFN- α présentent moins de pDC circulantes que des patients non traités (Goutagny *et al.*, 2004). Il est ainsi possible que l'apoptose des pDC au cours d'infections virales permettrait leur contrôle et celui d'autres cellules immunes, et ainsi éviter le développement de syndromes auto-immuns (Swiecki *et al.*, 2011).

Il a été montré que le renouvellement des populations de cDC en particulier, était important pour éviter la survenue de signes d'auto-immunité (Chen *et al.*, 2006). Les cDC étant à l'interface entre l'immunité innée et adaptative le contrôle de leur activité est donc primordial. Ces mécanismes font intervenir un certain nombre de voies de régulations débouchant sur la mort des cDC pour éviter une activation aberrante des réponses immunes.

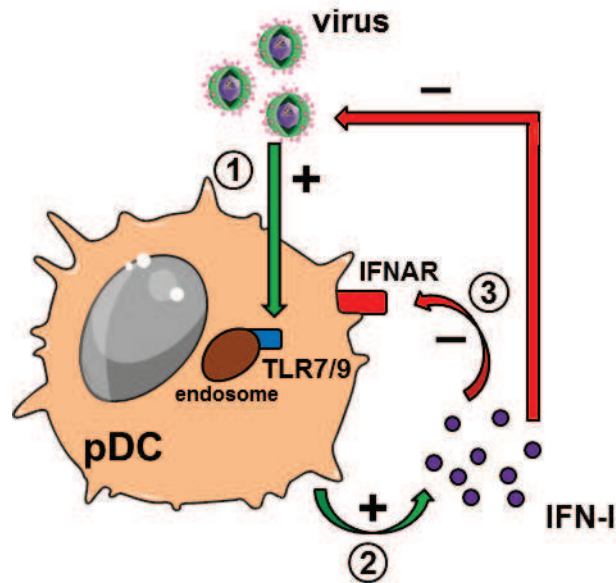


Figure 10 : Mécanisme de rétrocontrôle négatif des pDC par l'IFN-I. 1) Les pDC vont être activées par l'intermédiaire d'une stimulation de leur TLR7 et TLR9 suite à une infection virale. 2) Les pDC activées vont sécréter de grandes quantités d'IFN-I. 3) L'IFN-I va permettre d'une part de lutter contre l'infection virale, et d'autre part de faire rentrer les pDC en apoptose de façon dépendante du récepteur à l'IFN-I (IFNAR).

1. Régulation de la survie des cDC lors de la réponse inflammatoire

Les cDC ont pour principale fonction d'intégrer et de présenter l'antigène aux LT afin d'activer la réponse immunitaire adaptative. Dans certaines conditions, les cDC vont orienter la différenciation des LT vers des profils inflammatoires et peuvent, si elles ne sont pas contrôlées, favoriser un devenir pathologique. Par exemple, l'immunisation de souris avec un grand nombre de cDC activées va conduire au développement d'auto-immunité (Ludewig *et al.*, 1998; Roskrow *et al.*, 1999). Il existe donc différents mécanismes permettant d'éviter aux cDC d'entretenir la réaction inflammatoire de manière disproportionnée.

1.1 L'apoptose des cDC dans la régulation de l'inflammation

L'apoptose est un phénomène primordial pour assurer le bon fonctionnement des réponses immunitaires. La tolérance au soi est même garantie par cette mort programmée des cellules. Ainsi, des souris *lpr* (pour *lymphoproliferation*) et *gld* (pour *generalized lymphoproliferative disease*), déficientes pour les voies de Fas/FasL engageant la voie extrinsèque de l'apoptose, vont déclarer des syndromes lymphoprolifératifs (Nagata and Suda, 1995). Le lien entre apoptose des cDC et le maintien de réponses immunes contrôlées a été établi dans une étude de 1999. Les auteurs de ces travaux ont observé que des personnes atteintes du syndrome lymphoprolifératif auto-immun, porteur d'une mutation de la caspase 10 entraînant un défaut d'apoptose, présentaient une accumulation des cDC (Wang *et al.*, 1999). Ce défaut d'apoptose pourrait également toucher les LT provoquant le déclenchement des signes d'auto-immunité. Cependant, quand les voies de l'apoptose sont spécifiquement inhibées dans les LT, aucun symptôme de

maladie auto-immune ne se déclare (Chen *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 1996). Des travaux antérieurs ont également montré que les cDC présentant un antigène (de l'ovalbumine) entraient en contact avec des LT spécifiques avant de disparaître des ganglions. Ceci n'était pas retrouvé avec des cDC ne présentant pas l'antigène (Ingulli *et al.*, 1997). L'ensemble de ces travaux laisse à penser que l'apoptose des cDC est primordiale dans la prévention de réactions auto-immunes. Plus précisément, il a été montré que des souris transgéniques dont les cDC exprimaient spécifiquement la protéine inhibitrice de la caspase 8, p35 issu du baculovirus, voient leurs cDC s'accumuler, et les LT très fortement activés. De plus, le transfert adoptif de ces cDC présentant un défaut d'apoptose, entraîne chez des souris receveuses naïves la production d'auto-Ac (Chen *et al.*, 2006). De la même manière, des souris déficientes en protéine pro-apoptotique Bim spécifiquement dans les cDC montrent une activation anormale des LT et la présence d'auto-Ac (Chen *et al.*, 2007). Toutes ces études tendent à démontrer que l'apoptose des cDC, par différents mécanismes, permet de réguler l'immunité adaptative.

1.2 Mécanismes pro-apoptotiques des cDC

L'apoptose peut être induite de différentes manières. Tout d'abord, un stress cellulaire trop important peut conduire à l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose, impliquant les mitochondries. Ensuite, la voie extrinsèque de l'apoptose peut être engagée par certaines molécules se fixant sur les récepteurs de mort comme Fas et TRAILR. Enfin, les lymphocytes cytotoxiques (cellules NK et CTL) sont également capables de contrôler la survie des cDC en produisant les molécules perforines/granzymes (voir partie I-1.2.2). Dans le cas des cDC, il a été montré qu'une stimulation par LPS augmentait l'expression de Fas à leur surface (Stranges *et al.*, 2007). Dans cette même étude, les auteurs ont ensuite généré des souris dont les DC étaient spécifiquement déficientes pour Fas. Chez ces souris, la manifestation de plusieurs signes d'auto-immunité dont des auto-Ac anti-nucléaires (ANA), une hyperimmunoglobulinémie ainsi qu'une splénomégalie ont été observés dès la 8^{ème} semaine de développement, sans aucun traitement (Stranges *et al.*, 2007). La régulation de la survie des cDC pour limiter une activation trop forte de l'immunité adaptative passe donc en partie par la voie Fas/FasL (Chen *et al.*, 2012b; Stranges *et al.*, 2007). Cette apoptose des cDC n'interviendrait qu'une fois que les cDC ont présenté l'antigène, c'est-à-dire quand elles sont localisées dans un ganglion périphérique (Ingulli *et al.*, 1997). Les cellules capables d'apporter le signal activateur de l'apoptose (FasL), pourraient être les LT. D'ailleurs, les LT CD8⁺ CCR7⁻ L-selectine⁻ ont été identifiés comme capables de migrer dans le ganglion et de tuer les cDC présentant l'antigène de façon spécifique (Guarda *et al.*, 2007). Les LT CD8⁺ ont aussi montré une capacité à tuer les cDC dans un contexte tumoral (Hermans *et al.*, 2000). Plus récemment les LT CD8⁺ ont été identifiés comme directement responsables de la mort des cDC par la voie Fas/FasL (Chen *et al.*, 2012b). Si Fas/FasL est un mécanisme bien décrit d'induction de la mort cellulaire, les fonctions cytotoxiques des LT CD8⁺ passent aussi largement par le système perforine/granzyme. Cette voie a ainsi été étudiée, et plusieurs études rapportent qu'un dysfonctionnement de la perforine peut conduire à des désordres immunitaires. En effet, dans un modèle où des souris déficientes pour la perforine (perf^{-/-}) sont

immunisées avec des cDC présentant l'antigène, une prolifération anormale des LT CD8⁺ spécifiques est observée (Yang *et al.*, 2006), ceci étant dû à l'incapacité des CTL à éliminer les cDC dans les souris *perf*^{-/-}. La voie de la perforine est donc bien impliquée dans la régulation de la survie des cDC et le contrôle de la réponse inflammatoire. Ce mécanisme a aussi été rapporté dans des modèles murins tumoraux, où les Treg (Boissonnas *et al.*, 2010) vont éliminer les cDC par la voie de la perforine, limitant ainsi l'immunité anti-tumorale. Chez l'Homme aussi, la cytotoxicité dépendante de la perforine est primordiale pour le maintien d'une réponse immunitaire contrôlée. En effet, une déficience au niveau du gène de la perforine va provoquer le développement d'une hémophagocytose lymphohistiocytaire (HLH), une pathologie présentant les signes d'une forte activation des cellules immunitaires (Clementi *et al.*, 2001; Stepp *et al.*, 1999). Un modèle de HLH a été développé chez la souris *perf*^{-/-}, chez qui, l'infection par le LCMV va provoquer les mêmes symptômes que chez l'Homme (Jordan *et al.*, 2004; Matloubian *et al.*, 1999). Une forte activation des LT caractérisée par la production d'IFN- γ par les LT CD8⁺ dans les organes lymphoïdes a été rapportée (Terrell and Jordan, 2013). Cette même étude a démontré que c'est l'apoptose des cDC induite par la perforine apportée par les CTL, qui empêche l'activation aberrante des LT responsables des symptômes de la HLH. Finalement, les voies de la perforine et de Fas pourraient toutes les deux être à l'origine de la mort des cDC par apoptose afin d'éviter une inflammation trop forte. Des données montrant que des souris double déficientes *perf*^{-/-}/*lpr* présentent une auto-immunité sévère avec une très forte inflammation létale, 8 semaines après la naissance, vont dans ce sens (Peng *et al.*, 1998; Spielman *et al.*, 1998). Plus récemment, des travaux utilisant des souris *perf*^{-/-} présentant des cDC spécifiquement déficientes en Fas (*perf*^{-/-}/DC-Fas^{-/-}) ont clairement établi ce mécanisme. Ces souris doublement transgéniques vont présenter à la fois une survie réduite, et une activation spontanée des LT accompagnée d'une sécrétion d'IFN- γ importante (Chen *et al.*, 2012b). Chez ces souris, ce sont aussi les CTL qui vont provoquer la mort des cDC. L'ensemble de ces études montre que la perforine et Fas sont deux voies utilisées par les CTL pour contrôler la survie des cDC afin de limiter la réponse inflammatoire (figure 11).

L'élimination des cDC par apoptose après qu'elles aient activé les LT est un mécanisme primordial, ceci afin d'éviter le développement de réponses inflammatoires incontrôlées. L'absence de contrôle de la survie des cDC va en effet participer à la survenue de syndromes de type auto-immun. L'apoptose cellulaire, de façon plus générale, joue également un rôle important dans la tolérance au soi, notamment en permettant l'élimination rapide et efficace des cellules mourantes, pouvant être source d'auto-antigènes.

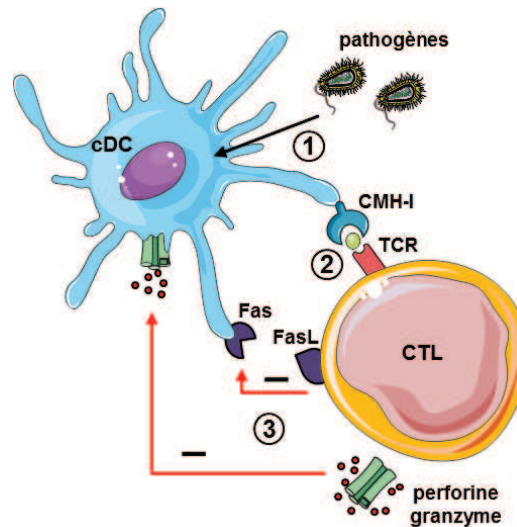


Figure 11 : Contrôle de la survie des cDC par les CTL dans les réponses inflammatoires. 1) Suite à une infection les cDC vont endocyter les pathogènes. 2) Les peptides antigéniques vont être préparés et présentés par les cDC aux CTL par l'intermédiaire du CMH-I. 3) Les fonctions effectrices des CTL vont être activées, permettant la mise en place de la réponse inflammatoire. En parallèle les voies de Fas/FasL et perforine/granzyme vont induire la mort des cDC par apoptose, afin de prévenir une sur-activation des réponses adaptatives.

2. Efferocytose et tolérance

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire qui permet l'élimination de cellules devenues indésirables tout en contrôlant la réponse immunitaire (Kerr *et al.*, 1972; Raff, 1992). Ce processus silencieux mais actif, contrôle le système immunitaire par deux mécanismes principaux. Tout d'abord les cellules apoptotiques relarguent des cytokines anti-inflammatoires telles que du TGF- β , de l'IL-10 et PGE2 (Chen *et al.*, 2001; Voll *et al.*, 1997). Ensuite, les cellules entrant en apoptose vont être prises en charge rapidement et efficacement par des phagocytes, empêchant ainsi la libération du contenu des corps apoptotiques (protéases, médiateurs inflammatoires) dans le milieu extracellulaire (Savill *et al.*, 1993). Ce processus d'efferocytose, induit la reprogrammation des phagocytes et des cellules présentatrices d'antigène qui vont elles aussi sécréter un microenvironnement anti-inflammatoire (Bonnefoy *et al.*, 2011b; Fadok *et al.*, 1998; Morelli *et al.*, 2003; Perruche *et al.*, 2008). Ces propriétés pro-résolutives, anti-inflammatoires ou immunomodulatrices, en fonction du contexte, associées à ces mécanismes ont d'ailleurs été utilisées avec succès dans plusieurs modèles pour limiter l'inflammation. Dans certains modèles murins de pathologies auto-immunes comme le diabète (Xia *et al.*, 2007) ou encore l'arthrite (Perruche *et al.*, 2009a), l'injection de cellules apoptotiques va fortement réduire la sévérité de la maladie, notamment grâce à l'augmentation de populations de LT effecteurs régulateurs telles que les Tr1 producteurs d'IL-10, et les Th3 FoxP3⁺, producteurs de TGF- β . Les propriétés immuno-modulatrices des cellules apoptotiques ont aussi été largement utilisées dans de nombreux modèles de transplantation. Ainsi les cellules apoptotiques ont permis de limiter le rejet de greffe cardiaque (Wang *et al.*, 2006), de greffe d'ilots pancréatiques (Mougel *et al.*, 2012), mais aussi de favoriser la prise de greffe de cellules

hématopoïétiques (Bonney *et al.*, 2011b; Kleinclauss *et al.*, 2006; Perruche *et al.*, 2004) ou de prévenir la survenue de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD pour *Graft versus host disease*) (Kleinclauss *et al.*, 2006). La prévention de la GvHD a même été confirmée chez l'Homme (Mevorach *et al.*, 2014). L'apoptose et l'efferocytose sont donc deux mécanismes permettant de contrôler la réponse immunitaire.

2.1 Effets immuno-modulateurs des cellules apoptotiques

L'effet tolérogène généré par les cellules apoptotiques peut provenir de deux mécanismes distincts : ceux directement médiés par les cellules apoptotiques, et ceux induits lors de leur élimination par les phagocytes. Les phagocytes vont sécréter un certain nombre de facteurs créant ainsi un microenvironnement immuno-modulateur permettant de maintenir à l'écart le système immunitaire.

Au cours du processus d'apoptose, les cellules apoptotiques vont sécréter de l'IL-10 et du TGF- β , deux cytokines aux propriétés immunosuppressives (Chen *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 1998). Le TGF- β en particulier va permettre d'inhiber la sécrétion de cytokines comme le TNF et l'IL-1 β par les macrophages (Fadok *et al.*, 1998; McDonald *et al.*, 1999), ce qui va induire une reprogrammation de ces cellules et favoriser la résolution de l'inflammation. Par exemple l'apoptose de neutrophiles et de LT va également favoriser l'expression de CCR5 à leur surface, permettant la capture de certaines chémokines comme CCL3 et CCL5 (figure 12), limitant ainsi le recrutement d'autres leucocytes (Ariel *et al.*, 2006). Cependant, si les cellules apoptotiques ne sont pas phagocytées, elles entrent en apoptose tardive puis en nécrose, favorisant une réponse inflammatoire à cause notamment des signaux de danger intracellulaires qu'elles vont déverser. Les phagocytes sont donc essentiels pour internaliser les cellules apoptotiques, et ils vont aussi participer activement à la mise en place du microenvironnement immuno-modulateur.

Les macrophages sont les phagocytes qui vont internaliser les cellules apoptotiques le plus efficacement (Fadok *et al.*, 1998; Miyake *et al.*, 2007). L'expression de nombreux récepteurs *scavenger* à leur surface (voir partie I-1.2.1) permet une reconnaissance adaptée des cellules apoptotiques et leur phagocytose. Certaines cDC, en particulier immatures, sont également capables de prendre en charge les cellules apoptotiques et d'induire des réponses tolérogènes (Iyoda *et al.*, 2002; Krispin *et al.*, 2006; Perruche *et al.*, 2008). Tout d'abord, l'internalisation des cellules apoptotiques par ces phagocytes permet de prévenir la libération dans le milieu extracellulaire du contenu des cellules mourantes, qui pourrait activer une réponse inflammatoire par l'intermédiaire de molécules de stress, comme HMGB1 par exemple (Scaffidi *et al.*, 2002). Ensuite, la phagocytose va déclencher des mécanismes plus actifs comme la sécrétion par les phagocytes de différents facteurs, comme des cytokines immuno-modulatrices telles que le TGF- β (Fadok *et al.*, 1998; Perruche *et al.*, 2008) et l'IL-10 (Voll *et al.*, 1997). De plus il a été montré que la phagocytose de cellules apoptotiques par les macrophages inhibe le facteur de transcription NF- κ B permettant la production de cytokines pro-inflammatoires (Sen *et al.*, 2007), avec pour conséquence la diminution de la sécrétion de cytokines telles que l'IL-12 et le TNF (figure 12) (Kim *et al.*, 2004; Perruche *et al.*, 2009a). L'importance des phagocytes dans l'induction de tolérance par les cellules apoptotiques a

été clairement établie dans plusieurs modèles d'inflammation chez la souris. Ainsi dans un modèle d'EAE, l'induction de l'apoptose des LT va améliorer le score de la maladie en induisant une polarisation des LT effecteurs en Treg grâce au TGF- β sécrété par les DC immatures. En effet, l'élimination des phagocytes par des liposomes chargés en clodronate va abroger l'effet tolérogène des cellules apoptotiques en supprimant l'induction de Treg (Perruche *et al.*, 2008). De la même manière, dans la greffe de cellules hématopoïétiques, l'injection de cellules apoptotiques va améliorer la prise de greffe grâce à l'augmentation de Treg induits par la sécrétion de TGF- β . Cette induction de Treg après l'injection de cellules apoptotiques est dépendante en particulier des macrophages (Kleinclauss *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données montre que les phagocytes sont capables suite à l'internalisation de cellules apoptotiques de participer à la mise en place d'un microenvironnement modulateur, induisant des populations de Treg contrôlant les réponses inflammatoires.

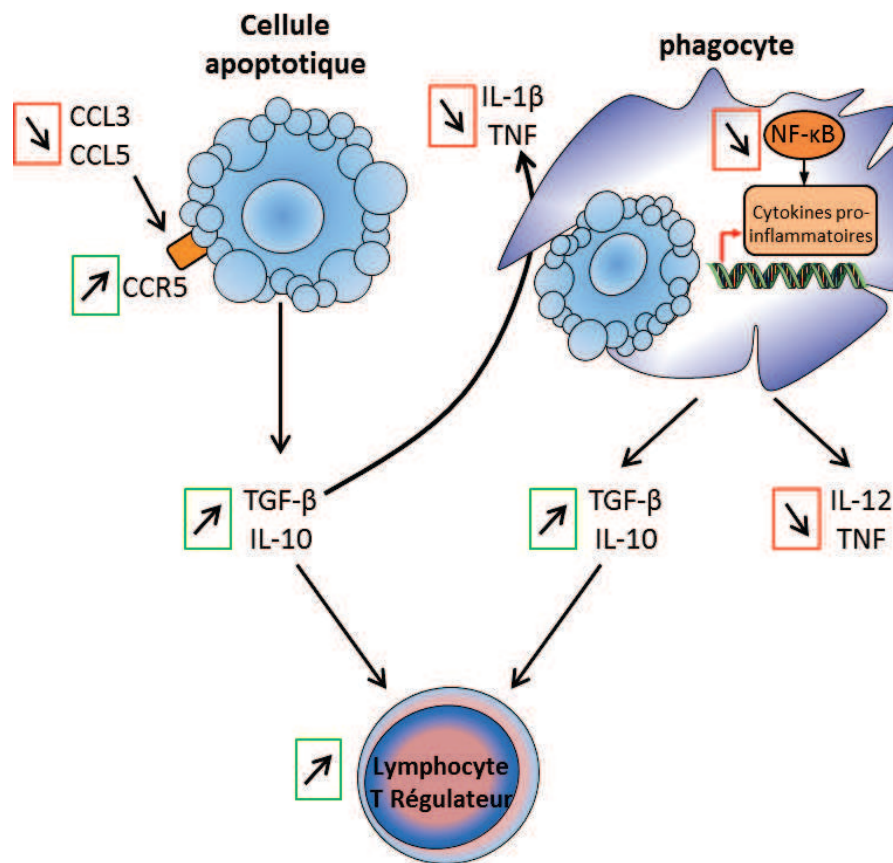


Figure 12 : Effets immuno-modulateurs des cellules apoptotiques. Les cellules apoptotiques vont limiter l'inflammation grâce à des mécanismes directs comme l'augmentation de l'expression de CCR5 à leur surface qui va neutraliser les chimokines CCL3 et CCL5 qui ont des propriétés de recrutement de leucocytes, en les capturant. Les cellules apoptotiques vont également sécréter du TGF- β et de l'IL-10 qui sont des cytokines aux propriétés immunosuppressives capables de favoriser l'induction de LT régulateurs. De plus le TGF- β a un effet direct sur les macrophages diminuant leur capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF. Les phagocytes ayant capturé les cellules apoptotiques vont aussi sécréter du TGF- β et de l'IL-10. La phagocytose va inhiber le facteur de transcription NF- κ B contrôlant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et le TNF qui va alors diminuer.

2.2 Induction des LT régulateurs par les phagocytes

Une fois que les phagocytes ont internalisé les cellules apoptotiques, elles vont devoir entrer en contact avec des LT naïfs afin d'orienter leur polarisation. Différentes études ont montré que les cDC, une fois qu'elles ont phagocyté des cellules apoptotiques vont exprimer à leur surface le récepteur de domiciliation ganglionnaire CCR7 (Ip and Lau, 2004; Verbovetski *et al.*, 2002). Les cDC vont ainsi pouvoir migrer au niveau du ganglion pour polariser les LT. De plus la phagocytose de cellules apoptotiques par les cDC ne va provoquer qu'une faible expression du CMH-II et des autres molécules de co-stimulation comme CD40 et CD83, contrairement à des cDC ayant phagocyté des cellules nécrotiques plus immunogènes qui vont induire une forte activation des LT (Ip and Lau, 2004). Une fois dans les ganglions, les cellules ayant phagocyté vont orienter la polarisation des LT naïfs vers des profils régulateurs comme les Treg induits Th3 FoxP3⁺ et les Tr1 producteurs d'IL-10 (Kleinclauss *et al.*, 2006; Perruche *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2007), notamment grâce au TGF- β . Cette induction de Treg va être responsable des effets tolérogènes observés dans les différents modèles inflammatoires décrits précédemment.

Les propriétés immuno-modulatrices des cellules apoptotiques sont donc largement utilisées pour inhiber les réponses inflammatoires observées par exemple, dans le rejet de greffe ou encore dans certaines pathologies auto-immunes. Une des méthodes utilisées pour induire l'apoptose cellulaire est l'injection d'un anticorps anti-CD3 (Ac α CD3) qui va provoquer la mort des LT. Cet Ac α CD3 a d'abord été utilisé pour son effet immunosuppresseur pour limiter le rejet de greffe, avant que les mécanismes sous-tendant ses propriétés tolérogènes ne soient évalués.

2.3 Propriétés de l'anticorps anti-CD3

L'Ac α CD3 cible donc l'antigène CD3 exprimé spécifiquement à la surface des LT et selon les clones utilisés va entraîner leur mort par apoptose, comme les clones 145-2C11 et OKT3 ciblant la sous-unité ϵ du CD3 murin et humain respectivement. Le premier clone à avoir été utilisé en thérapeutique est OKT3, d'origine murine. Son injection va provoquer une forte immunosuppression suite à la déplétion des LT. Les cliniciens ont tiré profit de cet effet en l'utilisant comme traitement contre le rejet de greffe. Ainsi, à partir de la fin des années 1980, OKT3 a été testé avec succès dans les greffes rénales, cardiaques ou encore hépatiques (Bristow *et al.*, 1988; Gordon *et al.*, 1988; Norman *et al.*, 1988). Cependant, certains problèmes ont été relevés. D'abord, l'immunosuppression induite est profonde et va ainsi provoquer une plus grande susceptibilité des patients aux infections, notamment à HSV et CMV (Singh *et al.*, 1988). Son efficacité par rapport à d'autres traitements immunosuppresseurs a donc été remise en cause (Barr *et al.*, 1990). De plus, l'origine murine de l'OKT3 induit un syndrome pseudo-grippal caractérisé par de fortes fièvres, et des troubles gastro-intestinaux (Chatenoud *et al.*, 1989; Cosimi *et al.*, 1981; OrthoMulticenterTransplantStudyGroup, 1985). Cet épisode inflammatoire provoqué par les Ac α CD3 OKT3 est dû à la partie Fc de l'Ac qui est d'origine murine et qui en se liant au Fc γ -R d'autres cellules par

sa partie Fc va induire une très forte activation des LT. Les progrès de la génétique moléculaire ont par la suite permis de fabriquer des Ac avec une partie Fc humanisée permettant de limiter l'activation cellulaire. Chez la souris, l'équivalent d'OKT3 est le clone 145-2C11 produit par le hamster, qui va reconnaître la sous-unité ϵ du marqueur CD3 des LT murins (Leo *et al.*, 1987). L'Ac α CD3 145-2C11 a également été utilisé pour ses propriétés immunosuppressives dans la greffe de peau chez la souris notamment (Hirsch *et al.*, 1988). De plus le syndrome pseudo-grippal décrit chez l'Homme avec l'OKT3 est aussi observé chez la souris avec le 145-2C11 avec des symptômes similaires (Ferran *et al.*, 1990).

2.3.1 Caractéristiques du syndrome pseudo-grippal

Pour expliquer la survenue du syndrome pseudo-grippal il faut s'intéresser aux propriétés de l'Ac α CD3 et à son effet *in vivo*. Tout d'abord, l'injection de l'Ac α CD3 145-2C11 chez la souris va induire une activation des LT qui a été identifiée pour la première fois par une augmentation de l'expression du récepteur à l'IL-2 (Hirsch *et al.*, 1989). Par la suite, la sécrétion d'un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires dans les premières heures suivant l'injection de l'Ac α CD3 a été mise en évidence. Ainsi le TNF, l'IFN- γ , l'IL-6, l'IL-2 et l'IL-3 sont cinq cytokines retrouvées dans le sérum de souris à partir de 90 minutes après un traitement par l'Ac α CD3 (Alegre *et al.*, 1990; Ferran *et al.*, 1990). Il est intéressant de noter que certaines souches de souris sont plus sensibles que d'autres à l'injection de l'Ac α CD3, faisant ainsi varier la composition des cytokines inflammatoires post- α CD3 (Ferran *et al.*, 1991a). Ainsi, suite au traitement par l'Ac α CD3 des souches Balb/c, CBA, C3H et NZW, le TNF est retrouvé chez les quatre souches, mais en plus faible quantité chez les souris Balb/c. En revanche l'IFN- γ est retrouvé uniquement chez les souris Balb/c. Enfin l'IL-2 est retrouvé chez toutes les souches, et l'IL-3 en plus grande quantité dans les souches Balb/c et CBA. Cet orage cytokinique décrit chez la souris a également été observé chez l'Homme après une injection d'OKT3. En effet, l'Ac α CD3 OKT3 chez l'Homme va provoquer une augmentation du taux sérique de TNF, ainsi que des cytokines comme l'IFN- γ et l'IL-2, uniquement produites par les LT (Chatenoud *et al.*, 1988, 1989). Enfin cette sécrétion de cytokines suite à l'injection de l'Ac α CD3 s'accompagne d'une hypothermie et d'une hypoglycémie (Alegre *et al.*, 1990). L'hypoglycémie en particulier serait une conséquence de la forte activation des LT qui vont consommer une grande partie du glucose disponible (Xia *et al.*, 2014a).

2.3.2 Les causes de l'orage cytokinique

L'Ac α CD3 va donc fortement activer les LT et c'est ce qui est à l'origine de cette très forte sécrétion de cytokines (Chatenoud *et al.*, 1991). Par ailleurs l'utilisation d'anti-inflammatoires tels que les corticoïdes va très fortement diminuer cet orage cytokinique. Chez l'Homme la co-administration de corticoïdes avec l'OKT3 va fortement diminuer la sécrétion de TNF, d'IFN- γ et d'IL-2 (Chatenoud *et al.*, 1990). De même chez la souris, la méthylprednisolone va inhiber la sécrétion de TNF, d'IL-2 et d'IL-6 ainsi que l'hypoglycémie et l'hypothermie causées par l'Ac α CD3 145-2C11 (Alegre *et al.*, 1991). La ciclosporine A, qui va spécifiquement inhiber la production d'IL-2 nécessaire à l'activation des LT, va

également inhiber l'orage cytokinique provoqué par l'Ac α CD3 (Murakami *et al.*, 1995). Cette propriété mitogénique de l'Ac α CD3 sur les LT est due à sa partie constante Fc. Ceci a été établi grâce à un Ac α CD3 F(ab')₂ dépourvu de partie Fc qui contrairement à l'Ac α CD3 intact ne va pas activer les LT (Hirsch *et al.*, 1990; Hirsch *et al.*, 1989). L'utilisation de l'Ac α CD3 F(ab')₂ chez la souris ne provoque d'ailleurs qu'une très faible hypoglycémie et pas d'hypothermie comparée à l'Ac α CD3 complet (Alegre *et al.*, 1990). C'est donc la capacité de l'Ac α CD3 à se lier aux récepteurs Fc d'autres cellules (*cross-linking*), les monocytes en particulier, qui va induire *in fine* le syndrome pseudo-grippal (Hirsch *et al.*, 1990).

Parmi les cytokines qui sont libérées après le traitement par l'Ac α CD3, certaines vont être plus importantes que d'autres pour réguler les réponses inflammatoires. Le TNF par exemple est une cytokine primordiale dans le contrôle de la sécrétion des autres cytokines inflammatoires. Chez la souris l'inactivation du TNF par un Ac bloquant va diminuer la sécrétion d'IL-3 et d'IL-6 de façon dépendante de l'IFN- γ (Ferran *et al.*, 1994; Ferran *et al.*, 1991c). L'inactivation du TNF *in vivo* va également prévenir l'hypothermie et réduire fortement l'hypoglycémie induite par l'Ac α CD3 (Alegre *et al.*, 1990). Chez l'Homme l'utilisation d'un Ac anti-TNF permet également de prévenir le syndrome pseudo-grippal suite au traitement par OKT3 chez des patients greffés rénaux (Charpentier *et al.*, 1992). Le TNF est donc une cytokine primordiale dans la mise en place de la réaction inflammatoire provoquée par l'Ac α CD3. Par ailleurs il a été montré que la cytokine immuno-suppressive TGF- β était nécessaire pour contrôler l'orage cytokinique. En effet l'injection d'une dose sub-létale d'Ac α CD3 chez des souris TGF- β 1^{-/-} va provoquer une sécrétion incontrôlée de TNF et d'IFN- γ menant à la mort des souris (Perruche *et al.*, 2009b).

Les propriétés immunosuppressives de l'Ac α CD3 va donc s'accompagner d'une réaction inflammatoire très forte. Cependant l'Ac α CD3 reste utilisé, notamment sous sa forme F(ab')₂ non mitogénique pour sa capacité à induire de la tolérance, notamment dans des pathologies auto-immunes.

2.3.3 Propriétés tolérogènes de l'Ac α CD3

L'effet tolérogénique de l'Ac α CD3 a été pour la première fois décrit dans des modèles de diabète insulino-dépendants chez la souris NOD. Un traitement par l'Ac α CD3 chez des souris NOD ayant déclaré le diabète dans les 7 jours va induire une rémission complète et durable de la maladie (Chatenoud *et al.*, 1994). Cet effet n'est pas provoqué par une immunosuppression, car d'une part les cellules auto-réactives sont toujours présentes dans les souris NOD, et d'autre part les souris NOD traitées par l'Ac α CD3 sont capables de rejeter une greffe de peau allogénique (Chatenoud *et al.*, 1997; Chatenoud *et al.*, 1994). De plus, l'inhibition des réponses LT par la ciclosporine A va annuler l'effet bénéfique de l'Ac α CD3. Un phénomène de tolérance à long terme médié par des populations de LT serait donc à l'origine de la rémission des souris NOD. Ce mécanisme a été établi plus précisément, et il a été montré qu'une population régulatrice de LT CD4⁺CD25⁺ est responsable, par l'intermédiaire de la sécrétion de TGF- β , de la tolérance permettant la rémission du diabète dans les souris NOD (Belghith *et al.*, 2003).

Ce phénomène de tolérance induite par l'Ac α CD3 a aussi été observé dans des modèles murins d'EAE (Ochi *et al.*, 2006; Perruche *et al.*, 2008). En effet une administration orale de l'Ac α CD3 en prévention ou en traitement de la maladie, va permettre d'améliorer le score clinique de la pathologie d'EAE. Ceci s'accompagne d'une augmentation de la capacité suppressive des LT régulateurs $CD4^+CD25^+$ LAP⁺, qui vont être capables de retarder la survenue de l'EAE s'ils sont transférés à des souris immunisées avec le peptide responsable de la pathologie (Ochi *et al.*, 2006). Le mécanisme de mise en place d'une réponse LT régulatrice suite à un traitement par l'Ac α CD3 a été établi également dans un modèle d'EAE (Perruche *et al.*, 2008). Cette étude a montré que l'Ac α CD3 provoquait la sécrétion de TGF- β dépendante des phagocytes. De plus la présence de cellules phagocytaires est nécessaire à l'effet bénéfique de l'Ac α CD3 sur l'augmentation des Treg $CD4^+FoxP3^+$, et le score de la maladie. L'Ac α CD3 provoquant l'apoptose des LT, un modèle faisant intervenir la phagocytose des LT dans l'induction de tolérance par les Treg a été proposé (figure 13).

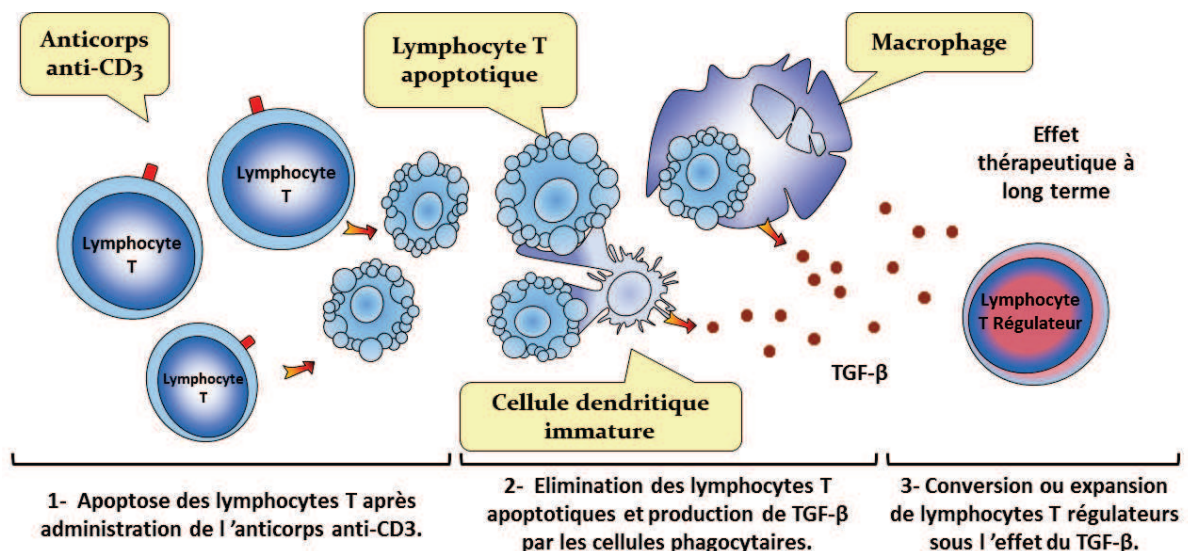


Figure 13 : Induction de la tolérance par l'Ac α CD3. Les LT vont s'activer suite à l'injection de l'Ac α CD3 puis rentrer en apoptose. Les LT apoptotiques vont être phagocytés par les cellules dendritiques et les macrophages. Les phagocytes ayant internalisé les cellules mourantes vont sécréter du TGF- β nécessaire à la polarisation de Treg responsables de l'effet tolérogène (Perruche and Saas, 2009).

En résumé, l'utilisation directe de cellules apoptotiques, aussi bien que l'induction de l'apoptose *in vivo* en utilisant par exemple un Ac α CD3, pouvait induire une tolérance susceptible d'améliorer certaines pathologies auto-immunes. Comme décrit précédemment (voir partie III-2.1) l'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire qui va participer activement à la mise en place de la tolérance, notamment grâce à l'intervention des phagocytes. Cependant les phagocytes dits professionnels (macrophages et cDC principalement) ne sont pas les seules cellules responsables de la tolérance induite par les cellules apoptotiques. Plus récemment, les pDC ont été impliquées dans l'induction de tolérance par les cellules apoptotiques.

3. Les pDC dans l'induction de tolérance

L'implication des pDC dans l'induction de tolérance par les cellules apoptotiques a été suggérée en premier par l'étude de Ochando *et al.* Dans ces travaux une tolérance au greffon cardiaque a été obtenue par injection de cellules du donneur (ou DST pour *donor-specific transfusion*), les pDC étant nécessaires à cet effet ((Bonnefoy *et al.*, 2011b; Ochando *et al.*, 2006). Du fait qu'une partie du mécanisme responsable de la tolérance induite par les DST ait été attribuée à la présence de cellules apoptotiques (Morelli and Larregina, 2010), il est possible d'imaginer que les pDC puissent participer à l'effet tolérogénique des cellules apoptotiques. Ceci a clairement été établi dans un modèle de greffe de cellules hématopoïétiques où la prise du greffon est induite par les cellules apoptotiques de façon dépendante des pDC (Bonnefoy *et al.*, 2011b). Dans cette étude, la prise de greffe est due aux pDC, qui dans un microenvironnement modulateur contenant du TGF- β produit par les macrophages ayant phagocyté, vont polariser les LT en Treg. En effet, l'élimination des pDC dans ce modèle va annuler l'effet bénéfique des cellules apoptotiques sur la prise de greffe.

Les propriétés immuno-modulatrices des pDC ne se limitent cependant pas au cadre du traitement par les cellules apoptotiques. Les fonctions tolérogènes des pDC qui vont principalement passer par une induction de LT CD4⁺ régulateurs, sont multiples et maintenant bien décrites. En effet les pDC ont la capacité lorsqu'elles sont activées *in vitro* par leurs voies TLR par des motifs CpG en particulier, de polariser des LT en Treg CD4⁺CD25⁺ (Moseman *et al.*, 2004). Néanmoins, les pDC peuvent aussi induire la polarisation de différentes populations de LT régulateurs *in vivo*. C'est le cas dans certaines situations cliniques associées à la tolérance, comme avec des patients atteints d'arthrite répondant au traitement (Kavousanaki *et al.*, 2010) ou encore avec des personnes atteintes de cancer (Zou *et al.*, 2001), chez qui les pDC sont capables de générer des LT avec un profil Tr1 qui vont produire de l'IL-10. Les pDC peuvent aussi favoriser la polarisation Treg FoxP3⁺ à partir de LT naïfs (Th3) (Bonnefoy *et al.*, 2011b; Ochando *et al.*, 2006). Enfin des études récentes ont établi que les pDC thymiques participaient à la différenciation des Treg naturels (nTreg) dans le thymus (Hanabuchi *et al.*, 2010; Martin-Gayo *et al.*, 2010). Cette induction de nTreg passe par l'activation des pDC par la TSLP (pour *thymic stromal lymphopoietin*) (Hanabuchi *et al.*, 2010). Par ailleurs, il a été montré que chez des souris atteintes d'EAE, les pDC étaient capables grâce à leur propriété de présentation antigénique passant par le CMH-II, de provoquer l'expansion de nTreg (Irla *et al.*, 2010).

Il existe plusieurs signaux apportés par les pDC qui vont conduire à la polarisation de populations LT régulatrices. L'utilisation d'un Ac bloquant la molécule de co-stimulation ICOSL sur les pDC a montré que cela neutralisait leur capacité à induire une polarisation Treg (Conrad *et al.*, 2012) et Tr1 (Ito *et al.*, 2007), mettant en évidence l'importance de l'interaction ICOS-ICOSL. Une autre voie permettant la génération de Treg par les pDC est celle de l'IDO. Cette enzyme capable de cataboliser le tryptophane en kynurénine, va appauvrir le milieu favorisant ainsi un environnement régulateur (Mellor and Munn, 2004). En effet, l'IDO va conduire à diminuer les réserves en tryptophane ce qui va avoir pour conséquence

directe d'inhiber la prolifération des LT. De façon intéressante, certaines populations de pDC dans un contexte tumoral vont exprimer l'IDO ce qui va leur conférer un fort pouvoir pro-tumoral (Munn *et al.*, 2004). Une stimulation des voies TLR7 et TLR9 des pDC va également augmenter leur expression d'IDO ce qui va leur permettre de polariser des LT naïfs en Treg (Chen *et al.*, 2008b; Manches *et al.*, 2008). Il a par ailleurs été montré que l'augmentation d'IDO par une stimulation des TLR était dépendante de la sécrétion de TGF- β par les pDC (Volpi *et al.*, 2012). D'autres types de stimulations des pDC par des ligands inhibiteurs comme CTLA-4-Ig, OX-2-Ig ou encore CD28-Ig vont provoquer l'expression d'IDO (Fallarino *et al.*, 2004; Mellor *et al.*, 2003).

Au final, les réponses immunitaires sont contrôlées de différentes manières. La plupart des épisodes inflammatoires font intervenir des LT effecteurs qui sont activés en premier lieu par les cDC. Le contrôle de la survie de ces cellules, par des mécanismes faisant intervenir les systèmes perforine/granzyme et Fas/FasL par exemple, est donc nécessaire pour éviter des réponses inflammatoires aberrantes. Cependant le système immunitaire est capable de réguler ces réponses et de maintenir une tolérance grâce aux différentes populations de LT régulateurs. Le rôle primordial de l'apoptose dans l'induction de cette sous population immuno-modulatrice de LT a par ailleurs été souligné. De façon plus particulière les pDC en plus d'intervenir dans la mise en place de réponses inflammatoires, sont aussi capables de générer des réponses tolérogènes en fonction des signaux qu'elles reçoivent. Les pDC sont donc des cellules possédant une dualité fonctionnelle qui vont devoir être régulées pour éviter des réponses immunitaires dysfonctionnelles.

IV- Objectifs des travaux de thèse

La mise en place de la réponse immunitaire va donc passer par des mécanismes faisant intervenir l'immunité innée et adaptative. Ces deux systèmes vont coopérer afin de se réguler mutuellement positivement et négativement afin de fournir une réponse adaptée. Les DC sont par excellence les cellules à l'interface entre ces deux types de réponses. Parmi les grands sous types de DC, il existe d'une part les cDC qui sont des CPA professionnelles qui vont être spécialisées dans l'activation des réponses LT, et d'autre part les pDC qui ont été initialement décrites comme des cellules productrices d'IFN-I spécialisées dans la lutte antivirale. Cependant il est aujourd'hui évident que les pDC vont aussi jouer un rôle dans l'activation des réponses immunitaires adaptatives, en modulant notamment le microenvironnement cytokinique. Les pDC vont ainsi pouvoir participer à la mise en place d'une réponse inflammatoire, et en cas de dysfonctionnement favoriser et maintenir la survenue de pathologies, et notamment de syndromes auto-immuns.

La régulation des fonctions de ces cellules est donc nécessaire au déroulement physiologique des réponses immunitaires. La voie de l'IFN-I en particulier a été identifiée comme permettant le contrôle de la survie des pDC, mais seulement dans un contexte d'infection virale. Les pDC étant aussi impliquées dans la mise en place de réponses inflammatoires non virales, une régulation de ces cellules doit intervenir dans ce contexte particulier pour maintenir une réponse immune physiologique. Le cas des cDC est de ce point de vue intéressant, car il existe une régulation de la survie de ces cellules pour éviter qu'elles n'activent trop fortement les réponses adaptatives en condition inflammatoire. Cette régulation passe par des mécanismes faisant intervenir les LT CD8⁺ cytotoxiques portant les signaux perforine/granzyme et FasL. Dans un contexte inflammatoire non viral, les pDC sont également capables d'induire des réponses T effectrices, ce qui va nécessiter un contrôle de ces fonctions. À notre connaissance, aucun mécanisme de contrôle des pDC, et plus précisément de la régulation de leur survie lors d'épisodes inflammatoires non viraux, n'a été décrit à ce jour. L'objectif de ce travail de thèse sera donc d'explorer les mécanismes permettant le contrôle des fonctions des pDC dans un contexte inflammatoire non viral, indépendant des IFN-I.

Résultats

I- Régulation de la survie des cellules dendritiques plasmacytoïdes par la voie de la perforine des LT CD8⁺ au cours d'une inflammation aigüe

Plasmacytoid dendritic cells die by the CD8 T cell-dependent perforin pathway during acute sterile inflammation

Running title: CD8 T cell perforin kill pDC during acute inflammation

Adrien Mossu*, †, ‡, §, Lucie Aubergeon*, †, ‡, §, Anna Daoui*, †, ‡, §, Francis Bonnefoy*, †, ‡, §, Philippe Saas*, †, ‡, §, and Sylvain Perruche*, †, ‡, §

*INSERM, UMR1098, F-25000 Besançon, France

†Univ. Bourgogne Franche-Comté, UMR1098, F-25000 Besançon, France

‡EFS Bourgogne Franche-Comté, UMR1098, F-25000 Besançon, France

§LabEx LipSTIC, ANR-11-LABX-0021, FHU INCREASE, F-25000 Besançon, France

Corresponding author: S.P., phone: +33381615615, fax: +33381615800,

sylvain.perruche@inserm.fr

Acknowledgments: A.M. is supported by a doctoral fellowship from the Region de Franche-Comté and the INSERM. This work was supported by the EFS (#2011-05 to SP), Agence Nationale de la Recherche (Labex LipSTIC, ANR-11-LABX-0021), Conseil Régional de Franche-Comté (“soutien au LabEX LipSTIC” 2014/2015 to P.S. and AAP 2013&2014 to S.P.).

Abbreviations: pDC: plasmacytoid dendritic cells

Manuscrit soumis dans la revue *The Journal of Immunology* le 24 août 2015, et en cours d'évaluation.

Dans le but de tester si une régulation des pDC intervenait dans un contexte d'inflammation, nous avons utilisé les propriétés de l'Ac α CD3 mitogénique (145-2C11) pour créer un environnement inflammatoire non viral aigu. En effet, l'utilisation de cet anticorps va nous permettre d'induire un environnement fortement inflammatoire chez la souris comme cela peut être le cas lors d'une infection, mais ne faisant pas intervenir l'IFN- α/β . Ce protocole va ainsi permettre de s'affranchir du fait que la survie des pDC peut être impactée par l'IFN- α/β lors d'infection virale (Swiecki et al., 2011). Ce modèle va nous permettre d'induire une forte activation des LT, accompagnée de la sécrétion de nombreuses cytokines inflammatoires. Une première expérience en amont de ce travail de thèse a montré que l'injection de cet Ac α CD3 provoquait la disparition des pDC dans les organes lymphoïdes, dont la rate, 4 jours après l'injection en particulier (figure 14).

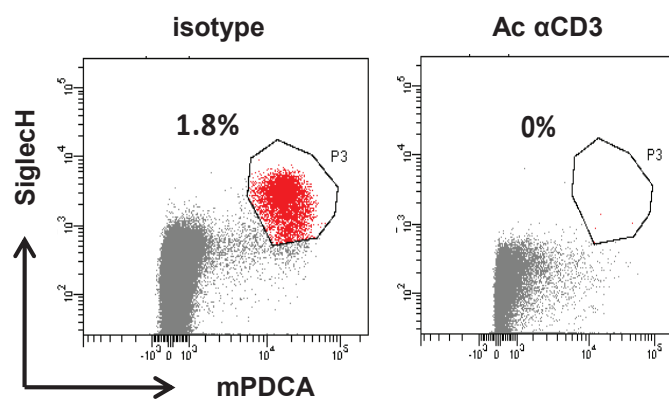


Figure 14 : Les pDC ne sont plus détectables 4 jours après injection de l'Ac α CD3. L'Ac α CD3 mitogénique (clone 145-2C11) ou un Ac isotypique (clone HTK888) ont été injectés en i.p. à des souris C57Bl/6 sauvages (WT) à raison de 50 μ g/souris. Les splénocytes ont été extraits, puis les pDC marquées pour être analysées en cytométrie de flux, 4 jours après injection. Les pDC sont les cellules SiglecH⁺mPDCA⁺ qui apparaissent en rouge. De plus ces cellules sont fenêtrées à partir des cellules CD19⁻NK1.1⁻ et elles expriment l'antigène B220 ainsi que CD11c de façon intermédiaire. Dans toutes nos expériences nous avons donc considéré les pDC comme étant les cellules CD19⁻NK1.1⁻B220⁺CD11c^{int}SiglecH⁺mPDCA⁺.

À partir de ce résultat nous avons voulu déterminer quel mécanisme était à l'origine de cette disparition des pDC suite à l'injection de l'Ac α CD3. Nous avons donc exploré plusieurs hypothèses, allant d'un mécanisme de perte des pDC dépendant de l'IFN-I comme observé dans les infections virales, jusqu'à un mécanisme similaire à celui décrit pour contrôler la survie des cDC. Tout d'abord nous avons dû montrer si la disparition des pDC suite au traitement par l'Ac α CD3 était due à une migration dans certains organes cibles, ou à un phénomène de mort cellulaire. Etant donné que l'Ac α CD3 provoque une très forte activation des LT, nous avons ensuite évalué si ceci pouvait être la raison primaire de cette déplétion de pDC. De plus nous avons testé si le même phénomène pouvait être observé dans un contexte inflammatoire impliquant les LT, comme dans la GvHD. L'effet le plus marquant provoqué par l'Ac α CD3 mitogénique étant la forte sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF et l'IFN- γ pouvant provoquer directement ou indirectement la mort cellulaire, l'implication des cytokines a aussi été investiguée dans la

déplétion des pDC. Enfin les LT CD8⁺ faisant partie des cellules activées dans notre modèle, nous avons émis l'hypothèse que les voies de cytotoxicité directes telles que le système perforine/granzyme pouvaient être responsables de la disparition des pDC, comme ce peut être le cas pour d'autres types cellulaires.

L'ensemble des expériences a tout d'abord permis de montrer que l'inflammation induite par l'Ac α CD3 provoquait l'apoptose des pDC dans les organes lymphoïdes, et non une migration de celles-ci dans d'autres organes comme l'intestin, le foie, la peau ou encore les poumons. Ensuite nous avons pu montrer que l'activation massive des LT, suite à la liaison de la partie Fc de l'Ac α CD3 aux Fc γ -R, était nécessaire à cette perte des pDC. Nous avons par ailleurs pu reproduire une diminution similaire des pDC en activant les LT dans d'autres modèles comme la GvHD et l'injection de SEA. Cependant nous avons montré que ce n'est pas la sécrétion de cytokines inflammatoires, suite à la forte activation des LT, qui était responsable de la déplétion des pDC. Au final ce sont donc les fonctions de cytotoxicité directe portées par les LT CD8⁺, et passant par la voie de la perforine qui sont responsables de l'apoptose des pDC dans notre modèle d'inflammation non virale. Ces résultats sont présentés ci-dessous, puis dans une seconde partie, d'autres résultats nous ayant permis d'orienter nos recherches vers le mécanisme de déplétion par les CTL sont détaillés.

ABSTRACT

Regulation of the inflammatory response involves the control of dendritic cell survival. To our knowledge, nothing is known about the survival of plasmacytoid dendritic cells (pDC) in such situation. pDC are specialized in type I interferons (IFN-I) secretion to control viral infections, and IFN-I also negatively regulate pDC survival during the course of viral infections. Here we asked about pDC behavior in the setting of virus-free inflammation. We report that pDC survival was profoundly reduced during different sterile inflammatory situations in the mouse, through a mechanism independent of IFN-I and TLR signaling. Indeed, we demonstrated that during inflammation, CD8⁺ T cells induced pDC apoptosis through the perforin pathway. The data suggest therefore that pDC have to be turned down during ongoing acute inflammation to not initiate autoimmunity. Manipulating CD8⁺ T cell response may therefore represent a new therapeutic opportunity for the treatment of pDC-associated autoimmune diseases such as lupus or psoriasis.

INTRODUCTION

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are considered as a major actor of the anti-viral immune response notably through the secretion of large amount of type-I IFN (IFN-I). To limit anti-viral immunity overresponse, in addition to inhibiting viral replication, IFN-I also provide a negative feedback to pDC, favoring pDC number contraction through apoptosis-dependent mechanism (1). However, pDC function is not limited to a direct anti-viral activity; they also play a role linking innate to adaptive immunity. Indeed, activated pDC have demonstrated their capacity to present and cross-present antigens to T cells (2), inducing effector T cell expansion, like memory CD8⁺ T cells and Th1 CD4⁺ T cells (3, 4). In addition, by producing various cytokines, such as IL-6 and IL-12 depending of the microenvironment, pDC can favor a flexible T cell polarization (5, 6). In this setting, the IFN-I independent negative feedback controlling pDC survival to avoid a pathological inflammation is unclear. In some autoimmune disorders, it has been shown that pDC play a direct role in the pathogenesis process, such as in systemic lupus erythematosus (SLE) (7) or psoriasis (8) for instance. Blocking pDC-dependent pathological mechanisms in these situations has been mostly associated with remission, suggesting that mechanisms controlling pDC survival, such as IFN-I, might be unpaired (7, 9).

Several mechanisms have been described for the control of the inflammatory immune response working in concert or independently, such as the limitation of antigen presentation through the killing of APC. It is described that APC apoptosis is crucial to maintain self-tolerance and, a deficiency in apoptosis leads to an accumulation of conventional dendritic cells (cDC) and the development of autoimmunity (10). The control of cDC turnover by apoptosis was even directly implicated in the maintenance of immune tolerance, as shown in DC-p35 transgenic mice in which autoimmune symptoms are observed due to the resistance of DC to cell death, with detection of autoantibodies and inflammatory cell infiltrates in the liver and kidneys (11). It is now demonstrated that the Fas pathway in cDC is directly involved to prevent systemic autoimmunity development. Indeed, autoimmune disorders have been reported in mice with Fas deficiency in APC, associated with the production of antinuclear antibody (Ab), hyperimmunoglobulinemia and splenomegaly (12). The control of cDC survival has been also shown to be linked to concomitant activation of CD8⁺ T cell, notably at the peak of the inflammatory response (13). Post-infection, effector CD8⁺ T cells are early controlled during the first phase of the inflammatory response, with the action of both IFN- γ and perforin controlling the expansion and the death of CD8⁺ T cells, respectively (14, 15). Whereas perforin controls CD8⁺ T cell homeostasis after antigen stimulation and therefore the inflammatory response, other cells might

also be sensitive to this negative feedback to control inflammation. In addition to Fas, it has been shown that CD8⁺ T cells could also eliminate cDC in vivo through the perforin pathway after multiple immunization episodes (16). Interestingly, in perforin deficient mice (Perf^{-/-}), an exacerbated immune response is observed after infection with lymphocytic choriomeningitis virus favoring the development of hemophagocytic lymphohistiocytosis (17, 18). Moreover, the accumulation of cDC described in Perf^{-/-}/DC-Fas^{-/-} mice, has highlighted the perforin and the Fas pathways in the control of cDC homeostasis in the control of inflammatory disorders (19). Both perforin-dependent CD8⁺ T cell and Foxp3⁺ CD4⁺ T cell regulation of cDC survival has been also implicated in regulating anti-tumor immunity (20, 21). In the context of sterile inflammation however, the IFN-I-independent negative feedback loop controlling pDC survival remains unclear. We therefore determined the fate of pDC in diverse acute sterile inflammatory situations.

MATERIALS AND METHODS

Mice and treatment

Five to 12 week old female and male C57Bl/6, BALB/c and B6D2F1 mice were obtained from Charles River laboratories (l'Arbresle, France) and kept in quarantine for at least 1 week before experimental procedure. Transgenic RAG- γ c^{-/-} and IFN γ ^{-/-} C57Bl/6 mice were bred in our specific pathogen-free rodent facility (agreement #D25-056-7) with access to food and sterile water (Hydropack, Plexx, The Netherlands) ad libitum. Transgenic FcR- γ chain^{-/-} mice were kindly provided by P. Bruhns (Institut Pasteur, Paris, France), TNFR1^{-/-} mice by B. Ryffel (CNRS-UMR7355, Orléans, France), TNFR2^{-/-} mice by B. Salomon (UPMC UMRS CR7 - Inserm U1135, Hopital la Pitié-Salpêtrière, Paris, France), MyD88^{-/-} mice by S. Akira & I. Coste (CRCL, Lyon, France), IFNAR^{-/-} mice by M Dalod (CIML, Marseille, France) and Perf^{-/-} mice by T. Walzer (INSERM U1111 – CNRS UMR5308, Université Lyon 1, Lyon, France). For anti-CD3 mAb treatment, mice received a single intraperitoneal (i.p.) dose of anti-CD3 mAb (50 μ g/mice, clone 145-2C11; kindly provided by L Chatenoud [Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris]) or isotype control (50 μ g/mice, clone HTK888; Biolegend, San Diego, CA). Anti-TNF mAb (300 μ g/mice, clone MP6-XT3; BD Biosciences) and anti-IFN- γ mAb (300 μ g/mice, clone XMG1.2; BD Biosciences) were injected i.p. 5 h before anti-CD3 mAb treatment. SEA was injected i.p. (2.5 mg/kg, Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Cyclosporine A was given twice per os (50 mg/kg; Neoral, Novartis, Rueil-Malmaison, France) 12 h before and after anti-CD3 treatment. FcR- γ chain^{-/-}/WT chimeras were generated by injecting i.v. 2.5 x 10⁶ cells from FcR- γ chain^{-/-} BM with equal number of WT BM cells into preconditioned C57Bl/6 mice

(7.5-Gy single-dose, 2.002 Gy/min; Clinac 2100c medical linear accelerator, Varian Medical System, Palo Alto, CA). Chimeras were controlled by flow cytometry in peripheral blood for equal donor reconstitution 2 weeks later before use. RAG- γ ^{-/-} mice were injected i.v. with 17×10^6 CD3⁺, 9×10^6 CD4⁺ or CD8⁺ T cells 24 h before anti-CD3 mAb treatment. Experimentation (#02831) was approved by the local ethics committee (#58) and the French Ministry of Higher Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) and was conducted in accordance with the European Union's Directive 2010/63.

Flow cytometry and cell sorting

Cell suspension were prepared from various tissues and stained at +4°C in PBS containing 2% FCS and 0.5% EDTA after CD16/CD32 blocking using 2.4G2 hybridoma supernatant. Antibodies were obtained from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France), eBioscience (Paris, France) or Biolegend (anti-siglecH [clone eBio440c], anti-mPDCA [clone 927], anti-CD19 [clone 1D3], anti-NK1.1 [clone PK136], anti-CD11c [clone N418], anti-CD45R/B220 [clone RA3-6B2], anti-IA/IE [clone M5/114.15.2], anti-CD3 [clone 145-2C11], anti-CD4 [clone RM4-5], anti-CD8 [clone 53-6.7], anti-CD25 [clone PC61], anti-CD45 [clone 30-F11], anti-CD45.1 [clone A20], anti-CD45.2 [clone104], anti-CD69 [clone H1.2F3], anti-CD107a [clone 1D4B], anti-granzyme B [clone NGZB], anti-IFN- γ [clone XMG1.2] and anti-H-2Kb [clone AF6-88.5]). The strategy for pDC gating corresponded to selection of the lymphoid population based on a FSC/SSC window, selection of the live cells from the previous gate through a SSC/Fixable Viability Dye window, selection of the CD19–NK1.1– cells on the previous, and then analysis of Siglec-H, mPDCA or B220 CD11c expressions on the previous cells to identify pDC as indicated. Apoptosis in pDC was evaluated through caspase staining using CaspACE FITC-VAD-FMK marker (Promega), following manufacturer's instructions. Dead cells were excluded using Fixable Viability Dye staining (eBioscience). Stained cells were analyzed on a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences) equipped with BD FACS Diva Software (BD Biosciences). Purified total, CD4⁺ or CD8⁺ T cells were negatively sorted from C57Bl/6 mouse spleens, using the Pan T Cell Isolation Kit II, the CD4⁺ T Cell Isolation kit or the CD8⁺ T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Paris, France), respectively, according to manufacturer's instructions.

Cell isolation and preparation

Bone marrow (BM) cells were issued from tibia and femur by RPMI flushing, peripheral lymph node (LN) cells were collected from brachial and inguinal and minced LN, and spleen cells

were obtained after collagenase D (2 mg/mL; Roche) digestion for 20 min at 37 °C in HBSS. Red blood cells were removed in BM and spleen suspensions by Ficoll-Paque density gradient (GE Healthcare). Skin cells or lung cells were obtained after collagenase D digestion (as for spleen), before gentleMACS™ (Miltenyi) dissociation and nylon mesh cell strainer (BD Biosciences) passage. Liver cells were obtained after collagenase D (2 mg/mL) and DNase I (150 U/mL; Sigma Aldrich) digestion for 30 min at 37 °C, before gentleMACS dissociation and centrifugation at 20 g for 4 min to remove the hepatocytes. Cells from duodenum were obtained after HBSS rinsing and slicing, collagenase D and DNase I digestion (as for liver) digestion nylon mesh cell strainer passage. After another wash with staining solution or PBS, cells were resuspended, counted and used.

Experimental graft-versus-Host disease models

Graft-versus-Host disease (GvHD) was induced using the parent into F1 without irradiation model or the C57Bl/6 into BALB/c background mismatch model with irradiation (22). For the parent into F1 model, B6D2F1 mice received i.v. 75×10^6 spleen cells from C57Bl/6 mice, or from B6D2F1 as control. For the GvHD model with irradiation, BALB/c mice received a total body irradiation 16 h before bone marrow transplantation (BMT). A 7.5-Gy single-dose TBI was applied (2.002 Gy/min; Clinac 2100c medical linear accelerator). BM cells were retrieved from C57Bl/6 mice, depleted from T cells using the CD3 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec) and injected in PBS (5×10^6 cells/mouse). GvHD was induced 14 d after BMT by the i.v. injection of 5×10^6 or 25×10^6 T cells sorted from C57Bl/6 spleens (Pan T Cell Isolation Kit II). BMT control mice not developing GvHD received PBS. Mice were given neomycin (1.1 g/l; Demavac, Longvic, France) in drinking water for 4 weeks post-BMT to reduce the infectious risk. Weight loss and signs of GvHD occurrence were monitored daily according to the Ferrara's clinical score (23).

Cytokine assay

Cytokine levels were determined in the plasma isolated from the blood of mice punctured 90 min after anti-CD3 mAb treatment using Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (CBA, BD Biosciences) according to manufacturer's instruction.

Statistical analysis

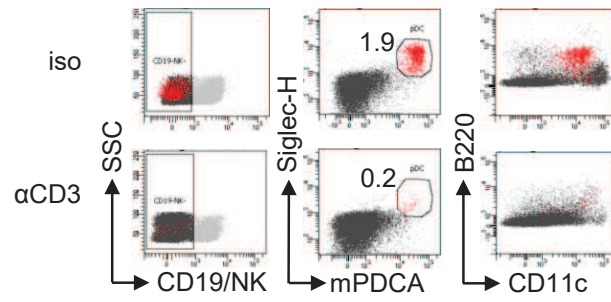
The means of groups were compared with an unpaired two-tailed Student t test or ANOVA test. P values <0.05 were considered statistically significant.

Results

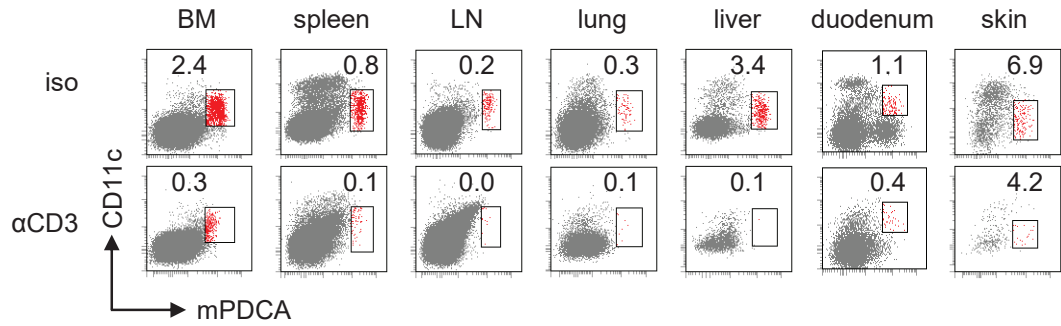
Anti-CD3 treatment impacts pDC survival in vivo

To evaluate the fate of pDC in a sterile inflammatory environment, we took the advantage of anti-CD3 specific monoclonal Ab (CD3) injection that has been demonstrated to induce a self-limited cytokine storm, known as the flu-like syndrome (24, 25), before inducing long term tolerance (26). Four days after CD3 treatment in naïve mice, we unexpectedly failed to detect pDC by flow cytometry, defined as $CD19^{-}NK1.1^{-}mPDCA^{+}SiglecH^{+}CD11c^{int}B220^{+}$ cells (Figure 15A) in spleen, LN and BM (Figure 15A and 15B). We therefore evaluated whether pDC have migrated to other organs and tissues upon CD3 injection but we observed, as in lymphoid organs, a strong reduction of pDC numbers in lung, liver, duodenum and skin, 4 days after CD3 injection (Figure 15B and 15C). This attests that in tissues containing pDC under normal situations, CD3-induced inflammatory environment favored a massive and wide pDC loss observable both in lymphoid organs and tissues. The kinetic of pDC depletion and replenishment was then assessed after CD3 treatment in BM, spleen and LN, and we observed that pDC numbers rapidly significantly declined over the first 8 days after treatment, reaching a maximum of depletion at day 4, and finally came back to normal numbers 9 days post-injection (Figure 15D). Since pDC were no longer detectable post-CD3 treatment, we evaluated pDC cell death using intracellular determination of activated caspases by flow cytometry with a labelled pan-caspase inhibitor (VAD-FMK). Ten to 15 h post-CD3 injection, we observed a strong expression of activated caspases in pDC compared to what observed in pDC from mice receiving isotype control, attesting for apoptosis induction in pDC (Figure 15E and 15F). Altogether, these results show that during a self-limited acute inflammatory episode pDC quickly undergo apoptosis and are widely depleted in lymphoid organs and peripheral tissues.

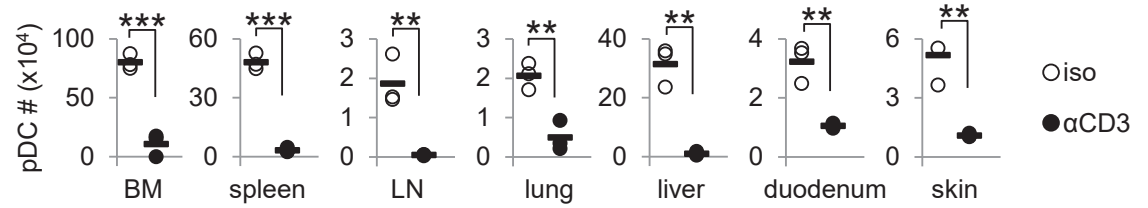
A



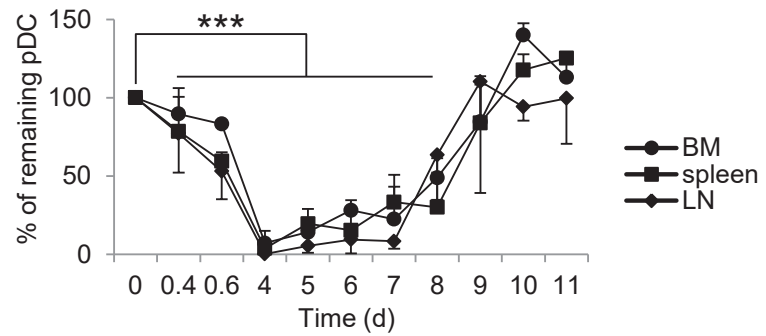
B



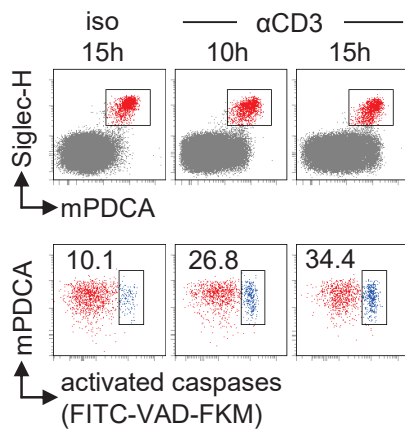
C



D



E



F

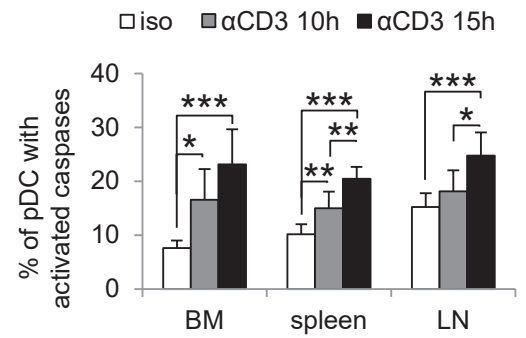


Figure 15. Plasmacytoid dendritic cells die by apoptosis and then recover after sterile inflammation associated with massive T cell activation

(A) FACS analysis of pDC ($CD19^-NK1.1^-mPDCA^+Siglec-H^+B220^+CD11c^{int}$) in the spleen of mice 4 days after receiving anti-CD3 mAb (α CD3, clone 145-2C11) or an isotype control (iso, clone HTK888). Numbers indicate pDC percentages in $CD19^-NK1.1^-$ cells. Data are representative of 14 independent experiments. (B and C) FACS analysis of pDC ($CD19^-NK1.1^-mPDCA^+CD11c^{int}$) in lymphoid organs and peripheral tissues 4 days after α CD3 or iso mAb injection. Percent of pDC from representative mice (B) and total numbers of pDC from individual mice are given plus mean (C) (n=3 mice per group) from one representative experiment out of 3. **=p < 0.01, ***=p < 0.001 (unpaired Student t test). (D) Kinetics of pDC depletion and replenishment in BM, spleen and LN after α CD3 mAb or iso treatment were assessed and depicted as the percent of remaining pDC. Day 0 = values obtained with isotype control. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=3 to 6 mice per group) and pooled from 4 independent experiments. ***=p < 0.001 (ANOVA test). (E and F) Activated caspases were evaluated in pDC $Siglec-H^+mPDCA^+$ by FACS in BM (E, F), spleen and LN (F) 10 and 15 h after α CD3 mAb injection or 10 h after iso mAb injection. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=9 mice per group) and pooled from 3 independent experiments. *=p < 0.05, **=p < 0.01, ***=p < 0.001 (ANOVA test).

T cell activation is associated with pDC number contraction

CD3 (clone 145-2C11) targets the CD3 ϵ subunit of the TCR complex that is exclusively expressed by T cells, and not by pDC (data not shown). To determine the role of T cells in pDC depletion, we used RAG- $\gamma c^{-/-}$ mice reconstituted or not with T cells. First, we did not observe any loss of pDC in RAG- $\gamma c^{-/-}$ mice injected with CD3-specific mAb (Figure 16A and 16B). However, when reconstituted with T cells and injected with CD3, RAG- $\gamma c^{-/-}$ mice shown a strong contraction of pDC in BM and spleen (Figure 16A and 16B), but not as profound as observed in WT mice (Figure 15). This result shows that in the context of CD3-induced sterile inflammation, T cells are necessary for pDC depletion. This data from RAG- $\gamma c^{-/-}$ mice injected with CD3 also excluded the implication of the Fc part of CD3 mAb in pDC depletion. The CD3-Fc part mediates the mitogenic effect of the CD3 (27). However, in RAG- $\gamma c^{-/-}$ immunodeficient mice, FcR crosslinking on pDC by CD3 is missing due to the absence of the CD3 antigen. Thus, to decipher whether CD3-dependent mitogenic effect is responsible for pDC depletion, we injected CD3 in Fc receptor gamma chain deficient mice (FcR- $\gamma^{-/-}$) that are invalidated for the expression of Fc- γ RI, Fc- γ RIII and Fc- γ RIV (28), or in WT littermates, and we observed 4 days later normal numbers of

pDC in BM and LN of FcR- $\gamma^{-/-}$ mice compared to WT littermates (Figure 16C and 16D). In the spleen of FcR- $\gamma^{-/-}$ mice, a decrease of pDC number was observed CD3 injection, but not as profound as observed in WT controls (Figure 16C and 16D). T cell depletion was also marginal in FcR- $\gamma^{-/-}$ mice after CD3 injection (data not shown). We therefore generated chimeric mice repopulated with hematopoietic cells from congenic WT mice (CD45.1⁺) for one half, and from FcR- $\gamma^{-/-}$ mice (CD45.2⁺) for the other half to determine the Fc/FcR pathway implication in pDC depletion during CD3-induced sterile inflammation. In the resultant chimeric mice, in which CD3-mitogenic effect is preserved and pDC harbor or not the FcR- γ , we observed 4 days after CD3 injection a significant depletion of both CD45.1⁺ (WT) and CD45.2⁺ (FcR- $\gamma^{-/-}$) pDC in spleen, LN and BM (Figure 16E). This result shows that pDC depletion is associated to CD3-induced T cell activation and not to the direct binding of the CD3 on pDC FcR- γ . This data also suggests that pDC depletion is concomitant with T cell activation. We therefore monitored CD69 expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells in WT mice, RAG- $\gamma^{-/-}$ mice reconstituted with T cells, FcR- $\gamma^{-/-}$ and chimeric FcR- $\gamma^{-/-}$ /WT mice after CD3 injection, and consistently observed a significant increase of CD69 expression in T cells, and more particularly in the CD8⁺ T cell subset in WT, RAG- $\gamma^{-/-}$ reconstituted with T cells and chimeric FcR- $\gamma^{-/-}$ /WT mice (Figure 16F). In contrast, we were not able to detect neither higher CD69 expression nor pDC depletion in FcR- $\gamma^{-/-}$ mice receiving CD3 injection (Figure 16F). This was also true when we used non-mitogenic anti-CD3 F(ab')² mAb injection in WT mice; no pDC depletion and few T cell activation were observed (Figure 16G). This is in line with reports showing that the cytokine storm is a monocyte-dependent T cell activation process which is not promoted by the anti-CD3 F(ab')² fragment (29). The mitogenic CD3 treatment results in monocyte activation, T cell activation-induced cell death and may favor the release of DAMP from stress cells and tissue destruction, as observed in the small intestine (30). Implication of the MyD88 signaling pathway that could be triggered by DAMP, was therefore investigated and similar pDC depletion was observed in MyD88^{-/-} and WT animals after CD3 treatment (Figure S1). This data demonstrates that pDC loss was independent of MyD88 upstream toll like receptor (TLR) and IL-1 receptor pathways. Altogether, our data clearly demonstrate that CD3-induced T cell activation is responsible for pDC depletion, independently of the CD3 binding to pDC.

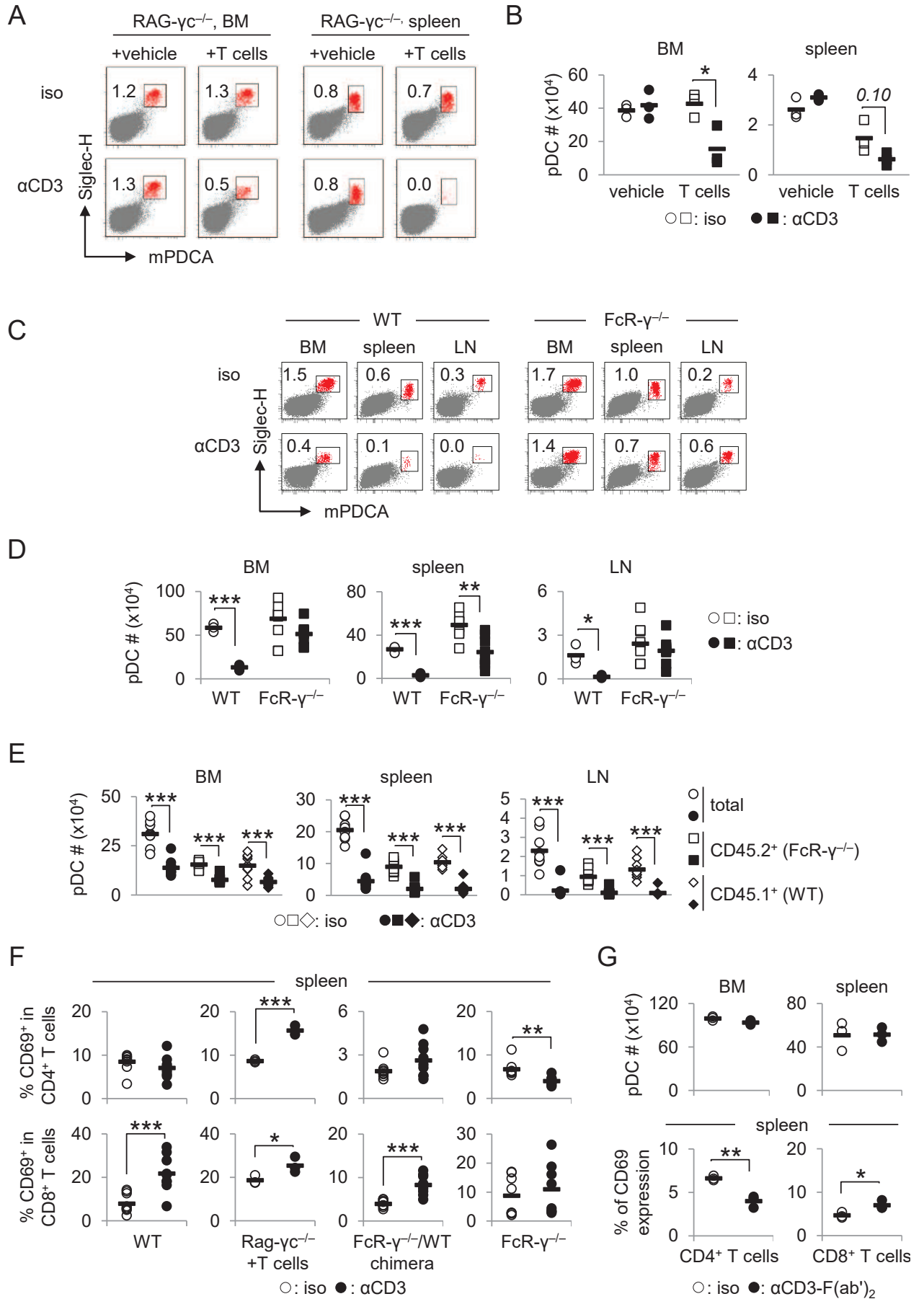


Figure 16. Activated T cells are necessary and associated with pDC depletion during anti-CD3 Ab-induced sterile inflammation

(A and B) FACS analysis of Siglec-H⁺mPDCA⁺ pDC in BM and spleen of RAG- γ c^{-/-} mice or T cell reconstituted RAG- γ c^{-/-} mice 4 days after α CD3 mAb or iso treatment. Representative dot plots with pDC percentages are shown (A) and total numbers of pDC from individual mice are given plus mean (B) (n=3 mice per group). Data from one representative experiment out of 2. *= $p < 0.05$ (unpaired Student t tests). (C and D) FACS analysis of Siglec-H⁺mPDCA⁺ pDC in BM, spleen and LN of WT and Fc γ R^{-/-} mice 4 days after α CD3 mAb or iso treatment. Representative dot plots with pDC percentages are shown (C). Total numbers of pDC from individual mice are given plus mean (D) (WT, n=3 mice/group; Fc γ R^{-/-} mice, n = 8 mice per group). Data from Fc γ R^{-/-} mice are pooled from 2 independent experiments. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$ (unpaired Student t test). (E) Total, CD45.1 (Fc γ R^{-/-}) and CD45.2 (WT) pDC were analyzed by FACS in the BM, spleen and LN of Fc γ R^{-/-}/WT chimera, 4 days after α CD3 mAb or iso treatment. Total numbers of pDC from individual mice are given plus mean (n=6 mice per group) and pooled from 2 independent experiments. ***= $p < 0.001$ (unpaired Student t test). (F) Expression of CD69 in CD4⁺ and CD8⁺ T cells was evaluated by FACS 4 days after α CD3 mAb or iso treatment in the spleen of WT (n=8 mice per group), T cell-reconstituted RAG- γ c^{-/-} (n=3 mice/group), Fc γ R^{-/-}/WT chimera (n=10 mice per group) and Fc γ R^{-/-} (n=8 mice per group) mice. Data are showed as individual mice plus mean from 9 independent experiments. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$ (unpaired Student t test). (G) Total numbers of pDC in BM and spleen, and expression of CD69 in CD4⁺ and CD8⁺ T cells as in (F) from the spleen of WT mice (n=3 mice per group) 4 days after α CD3 F(ab')₂ mAb or iso treatment. Data are shown as individual mice plus mean from 2 independent experiments. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$ (unpaired Student t test).

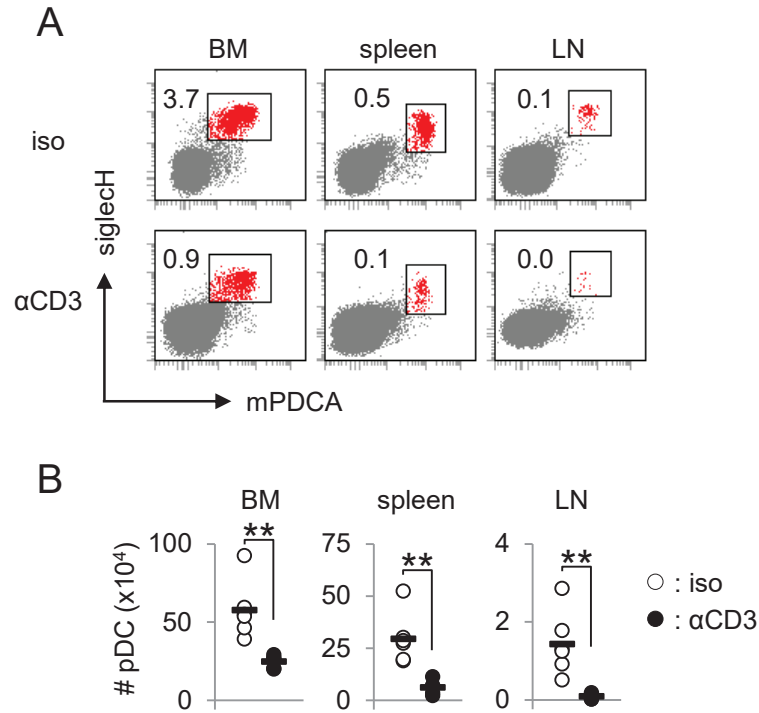


Figure S1 (Related to Figure 2). pDC loss after CD3-specific antibody treatment is independent of the MyD88 pathway. (A-B) FACS analysis of Siglec-H⁺mPDCA⁺ pDC in BM, spleen and LN of MyD88^{-/-} mice 4 days after αCD3 or iso mAb treatment (A). Total numbers of pDC from individual mice are given plus mean (n=6 mice per group) and pooled from 2 out of 3 independent experiments in (B). **= $p < 0.01$, (unpaired Student t test).

T cell-dependent inflammation affects pDC survival

Since T cell activation is associated with pDC depletion, we evaluated pDC behavior in other T cell-dependent inflammatory settings, such as during graft-versus-host disease (GvHD) or after superantigen injection. We first used the parent into F1 acute GvHD experimental model (C57Bl/6 cells into non-irradiated B6D2F1 mice) (22). Around 20 days post-graft, we observed a strong depletion of pDC, just as with CD3, in BM, spleen and LN, compared to control mice grafted with autologous spleen cells and not developing GvHD (Figure 17A). This was associated with a significant increased expression of IFN- γ in CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 17B). Thus, in the context of GvHD acute inflammation, pDC survival is strongly affected and correlates with T cell activation, but in such context, recipient pDC might be targeted by alloreactive donor C57Bl/6 T cells. To avoid alloreactivity against pDC, we then used a full H-2 mismatched acute GvHD model with an irradiation conditioning regimen (22), in which lethally conditioned host BALB/c mice were reconstituted with C57Bl/6 BM cells and received 14 days later, C57Bl/6 donor T cells to trigger acute GvHD. Recipient pDC were described depleted by the conditioning

regimen in that context (31), but bone marrow transplantation (BMT) allowed donor hematopoiesis and, contextually, reconstitution of the pDC pool from the donor. GvHD occurred one week after T cell transfer (Figure 17C) and mice were sacrificed. In lymphoid organs, a strong decrease of pDC numbers was observed compared to mice not receiving T cells (Figure 17D). In addition, pDC depletion was associated with GvHD severity since more T cells were infused, deeper was the pDC depletion (Figure 17D). As expected, CD4⁺ and CD8⁺ T cells highly expressed IFN- γ attesting for their activation (Figure 17E). These data clearly show that during acute GvHD, donor pDC survival was strongly reduced and associated with alloreactive donor T cell activation. Our results in the context of alloreactivity-induced inflammation demonstrated that pDC survival was impaired, mainly due to T cell activation, just as in the anti-CD3 mAb studies. Finally, injection of WT mice with a superantigen, Staphylococcal enterotoxin A (SEA), which cross-links the MHC and the TCR to induce a strong T cell activation (32), was also sufficient to favor pDC depletion in the spleen (Figure 17F), that correlated again with an increased expression of CD69 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 17G). Altogether, our data suggest that in an inflammatory environment associated with massive T cell activation, pDC survival is damped and associated with T cell activation.

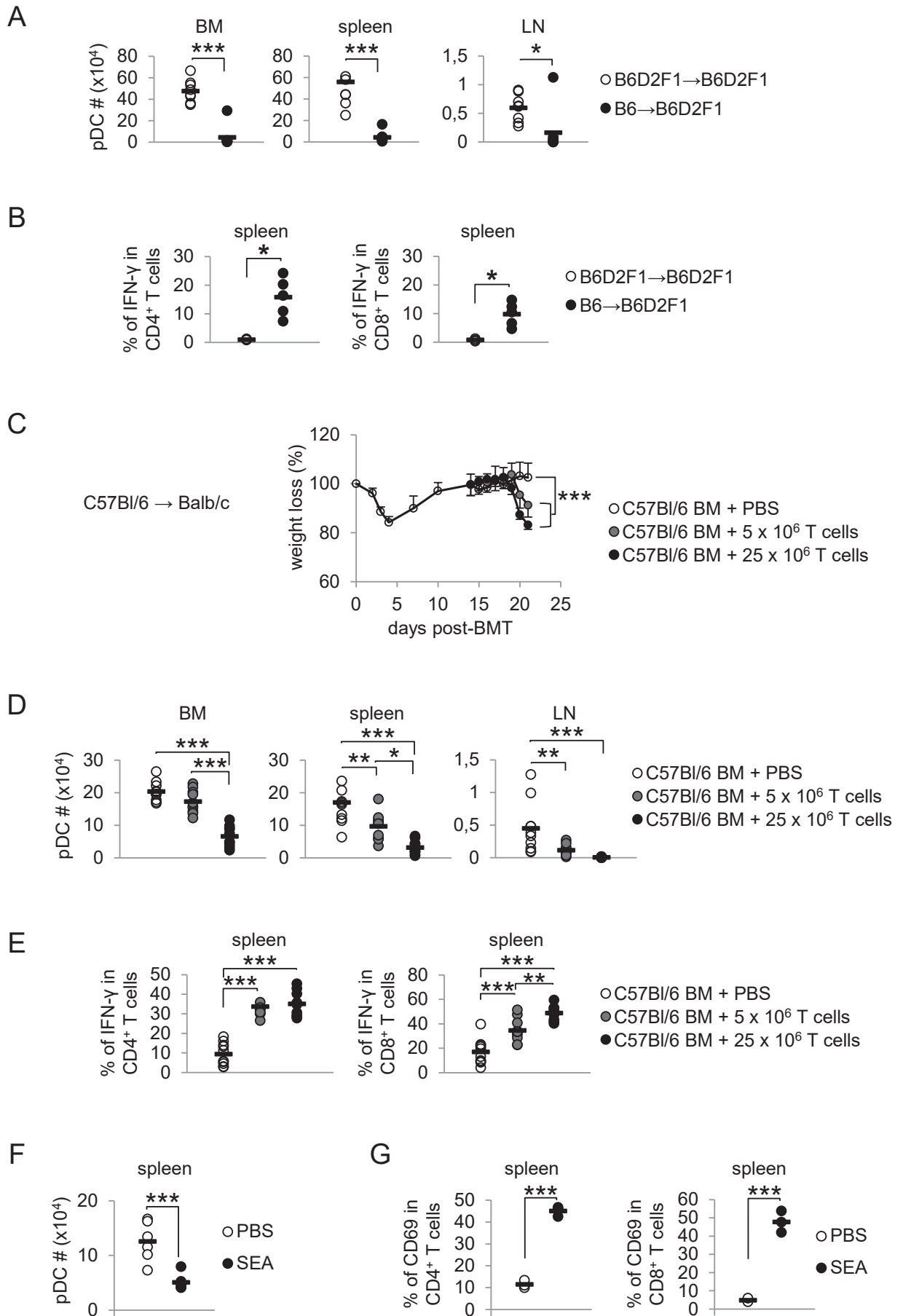


Figure 17. Plasmacytoid dendritic cells are depleted in GvHD and SEA-induced inflammatory settings

(A) Plasmacytoid DC were analyzed by FACS in the BM, spleen and LN of B6D2F1 mice suffering from GvHD or control B6D2F1 mice. Total numbers of pDC from individual mice are given plus mean (n=8 mice per group) and pooled from two independent experiments. $\ast=p < 0.05$, $\ast\ast\ast=p < 0.001$ (unpaired Student t test). (B) FACS analysis of intracellular expression of IFN- γ in CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells in the spleen of mice from (A), depicted as percentage from individual mice plus mean. $\ast=p < 0.05$ (unpaired Student t test). (C) Percentage of weight loss in BALB/c mice suffering from GvHD mice ($+5 \times 10^6$ T cells and $+25 \times 10^6$ T cells from C57Bl/6 mice) and controls (+PBS) over time. Data are shown as mean of 10 mice per group \pm SEM from two pooled independent experiments. $\ast\ast\ast=p < 0.001$ (ANOVA test). (D) pDC from the previous GvHD and control mice, as in (C), were analyzed in BM, spleen and LN by FACS. Total numbers of pDC from individual mice are given plus mean (n=10 mice per group) and pooled from 2 independent experiments. $\ast=p < 0.05$, $\ast\ast=p < 0.01$, $\ast\ast\ast=p < 0.001$ (ANOVA test). (E) Intracellular expression of IFN- γ was evaluated by FACS in CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells in the spleen of GvHD and control mice from (D). Percentages from individual mice are given plus mean (n=10 mice per group). $\ast\ast\ast=p < 0.001$ (unpaired Student t test). (F and G) pDC were analyzed by FACS and quantified in the spleen of mice receiving SEA 4 days earlier (F), and CD69 expression in CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells were analyzed in the spleen of mice 24 h after SEA treatment (G). Three (G) to 6 (F) mice per group. Data from 3 independent experiments. $\ast\ast\ast=p < 0.001$ (unpaired Student t test).

The cytokine storm does not participate to the loss of pDC

It has been described that T cell activation is accompanied with a cytokine storm initiated after CD3 injection or in the context of acute GvHD, which includes the major inflammatory cytokines, such as TNF and IFN- γ (33, 34). This inflammatory cytokine environment might be lethal for pDC. Since CD3-specific mAb induced-pDC depletion was independent of the IFN-I signaling pathway as attested by the fact that CD3 injection induced a similar pDC loss in IFNAR knockout mice and in WT littermates (Figure S2), we investigated the role of TNF and IFN- γ in the control of pDC survival. IFN- γ has been identified as an important cytokine capable of initiating uncontrolled inflammatory responses (19) that might consequently limit pDC survival. By neutralizing IFN- γ using blocking mAb, before CD3 injection, we did not observe a better pDC survival compared to mice receiving only anti-CD3 mAb treatment (Figure 18A and 18B). Expression of CD69 on CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells was still observed increased even when IFN- γ was neutralized before CD3 treatment, as in mice injected with only CD3 (Figure 18C). The role

of IFN- γ was further confirmed using IFN- $\gamma^{-/-}$ mice in which CD3 injection induced pDC depletion, as in WT littermates (Figure 18D). We then addressed the role of TNF using anti-TNF neutralizing mAb injection and we observed a significant better survival of spleen pDC compared to mice receiving only CD3 (Figure 18A and 18B). This improvement was nevertheless associated with a limited T cell activation, as highlighted by a few expression of CD69 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells after CD3/TNF neutralization treatments compared to mice receiving CD3 alone (Figure 18C). This is in line with the reports showing that the in vivo cytokine release induced by CD3 is a monocyte-dependent T cell activation process initiated by TNF but not IFN- γ (29). Since TNF can binds to TNF receptors (TNFR), and more specifically to TNFR1 which is associated to an intracellular death domain (35, 36), we then treated TNFR1^{-/-} or TNFR2^{-/-} mice with CD3. As observed in WT mice receiving CD3, pDC survival was strongly abolished in TNFR1^{-/-} and TNFR2^{-/-} transgenic mice receiving CD3 (Figure 18D). In these transgenic mice receiving CD3, CD69 expression was increased in T cells (data not shown), as CD3 injection did in WT mice. Our data confirm the preponderant role of TNF after CD3 injection to initiate the cytokine storm and clearly demonstrate that neither TNF nor IFN- γ is implicated in pDC depletion. To address the role of the other cytokines produced after CD3 injection on pDC survival, cyclosporine A (CsA) was injected in WT mice in addition to CD3. In the presence of CsA, the CD3-induced cytokine storm was severely inhibited since IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ , IL-6, IL-4 and IL-2 cytokine levels were greatly reduced (Figure 18E). However, the abrogation of the CD3-induced cytokine storm was not sufficient to prevent pDC depletion in lymphoid organs (Figure 18F). Taken together, these data demonstrate that the inflammatory context-resulting cytokines are not involved in the loss of pDC.

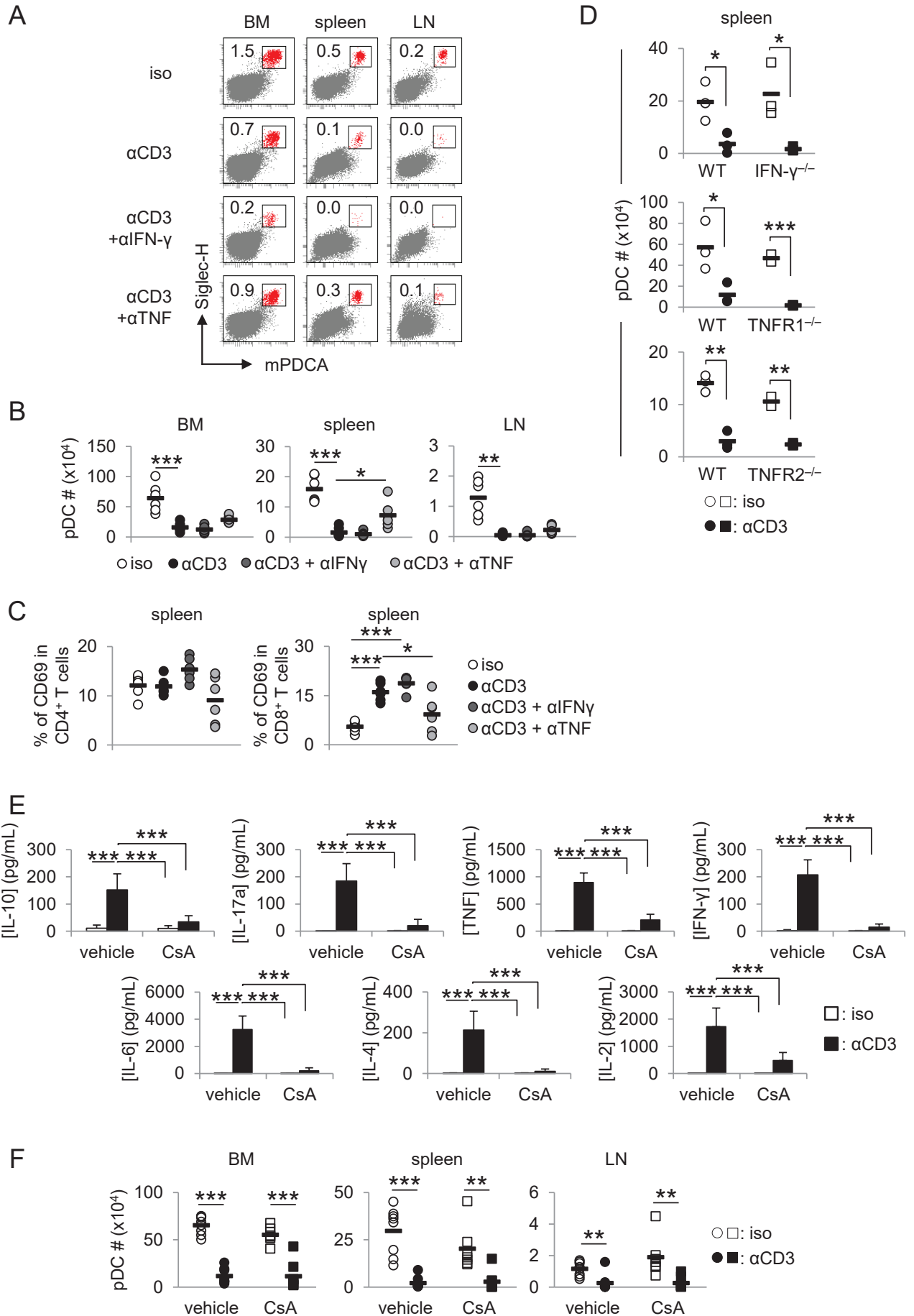


Figure 18. Flu-like syndrome cytokines are not involved in pDC depletion

(A-C) FACS analysis of Siglec-H⁺mPDCA⁺ pDC in BM, spleen and LN of mice 4 days after receiving iso or α CD3 mAb alone or after anti-TNF mAb or anti-IFN- γ mAb neutralization. Percentages of pDC in individual mice were indicated in (A). Total numbers of pDC from individual mice are given plus mean in (B). T cell activation was evaluated in the spleen of the previous mice as expression of CD69 in CD4⁺ and CD8⁺ T cells and depicted individually plus mean in (C). Data from 6 mice per group pooled from 2 independent experiments. *=p < 0.05, **=p < 0.01, ***=p < 0.001 (ANOVA test). (D) Loss of pDC was also evaluated in the spleen of WT, IFN- γ ^{-/-}, TNFR1^{-/-} or TNFR2^{-/-} transgenic mice by FACS, 4 days after anti-CD3 mAb or iso treatment. Total numbers of pDC from individual mice are given plus mean (n=3 mice per group), from 3 independent experiments. *=p < 0.05, **=p < 0.01, ***=p < 0.001 (unpaired Student t test). (E) IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ , IL-6, IL-4 and IL-2 levels were quantified in the plasma of mice 90 min after CD3 mAb or iso mAb treatment and cyclosporine A (CsA) given 12 h earlier or not (vehicle). Data are given as mean \pm SEM (n=8 mice per group) and pooled from 2 independent experiments. ***=p < 0.001 (ANOVA test). (F) In the previous mice, total numbers of pDC were also determined in BM, spleen and LN, 4 days after treatments and are given as individual mice plus mean. Pooled data from two independent experiments (n=8 mice per group) are shown. **=p < 0.01, ***=p < 0.001 (unpaired Student t test).

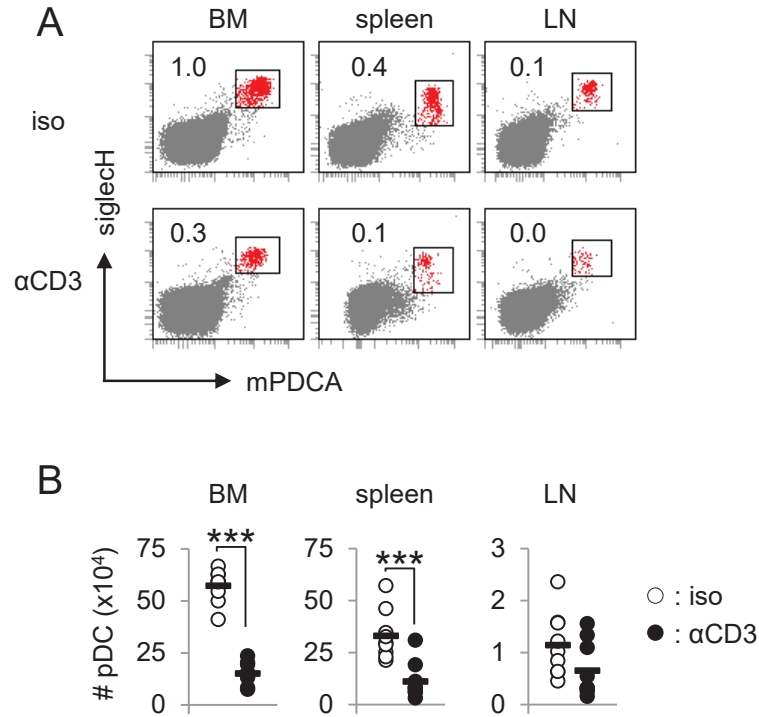


Figure S2 (Related to Figure 4). pDC loss after CD3-specific antibody treatment is independent of the IFN-I signaling. (A-B) FACS analysis of Siglec-H⁺mPDCA⁺ pDC in BM, spleen and LN of IFNAR^{-/-} mice 4 days after α CD3 or iso mAb treatment (A). Total numbers of pDC from individual mice are given plus mean (n=9 mice per group) and pooled from 3 independent experiments in (B). ***=p < 0.001, (unpaired Student t test).

The CD8⁺ T cell perforin pathway induces pDC death

Since the massive cytokine release following CD3 treatment cannot explain the pDC loss, we then evaluated the role of the cytotoxic factors produced by activated T cells, i.e., perforin/granzyme and FasL. Previous studies have implicated T cell cytotoxicity as a feedback mechanism to control cDC and regulate the inflammatory response (19). We therefore evaluated whether CD8⁺ T cells, capable of cytotoxic functions, may affect pDC survival in the context of sterile inflammation. Indeed, back to Figure 16F, CD8⁺ T cells appeared to be preferentially activated 4 days after CD3 injection when the pDC depletion is the deepest. Interestingly, RAG- γ c^{-/-} mice reconstituted with CD8⁺ T cells and receiving CD3 demonstrated deeper pDC depletion compared to RAG- γ c^{-/-} mice reconstituted with CD4⁺ T cells and receiving CD3 (Figure 19A). While either CD4⁺ or CD8⁺ T cell reconstitution induced a slight pDC number decrease in the BM of RAG- γ c^{-/-} mice after CD3 treatment, we observed profound depletion of spleen pDC only in CD8⁺ T cell-reconstituted RAG- γ c^{-/-} mice (Figure 19A). This correlates with what observed in WT mice, 10 and 15 h after CD3 injection, in terms of CD107a (a marker of degranulation) and

granzyme B expression on CD8⁺ T cells (Figure 19B and 19C). This time frame corresponds to the time of pDC apoptosis (Figure 15E and 15F). These data clearly demonstrate the preponderant role of cytotoxic CD8⁺ T cells in limiting pDC survival during sterile inflammation. Since granzyme B needs the perforin pathway to induce apoptosis (37, 38), we then injected CD3 in Perf^{-/-} mice. In the Perf^{-/-} mice, pDC survival was not altered by CD3 injection as attested by similar percentages and numbers of pDC in BM, spleen and LN as observed in isotype mAb-treated Perf^{-/-} and WT mice (Figure 19D and 19E). In addition, in Perf^{-/-} mice treated by CD3, despite that CD69 expression in CD8⁺ T cell was not increased compared to what observed in WT mice (Figure 19F), cytokine levels, including TNF and IFN- γ levels, were observed similar in both Perf^{-/-} and WT mice receiving CD3 (Figure 19G). Altogether these data support the finding that CD8⁺ T cells producing granzyme B and perforin upon activation are the main effector cells controlling pDC survival in the context of sterile inflammation. This negative feedback mechanism might limit over inflammation and prevent pDC-induced autoimmune pathology development.

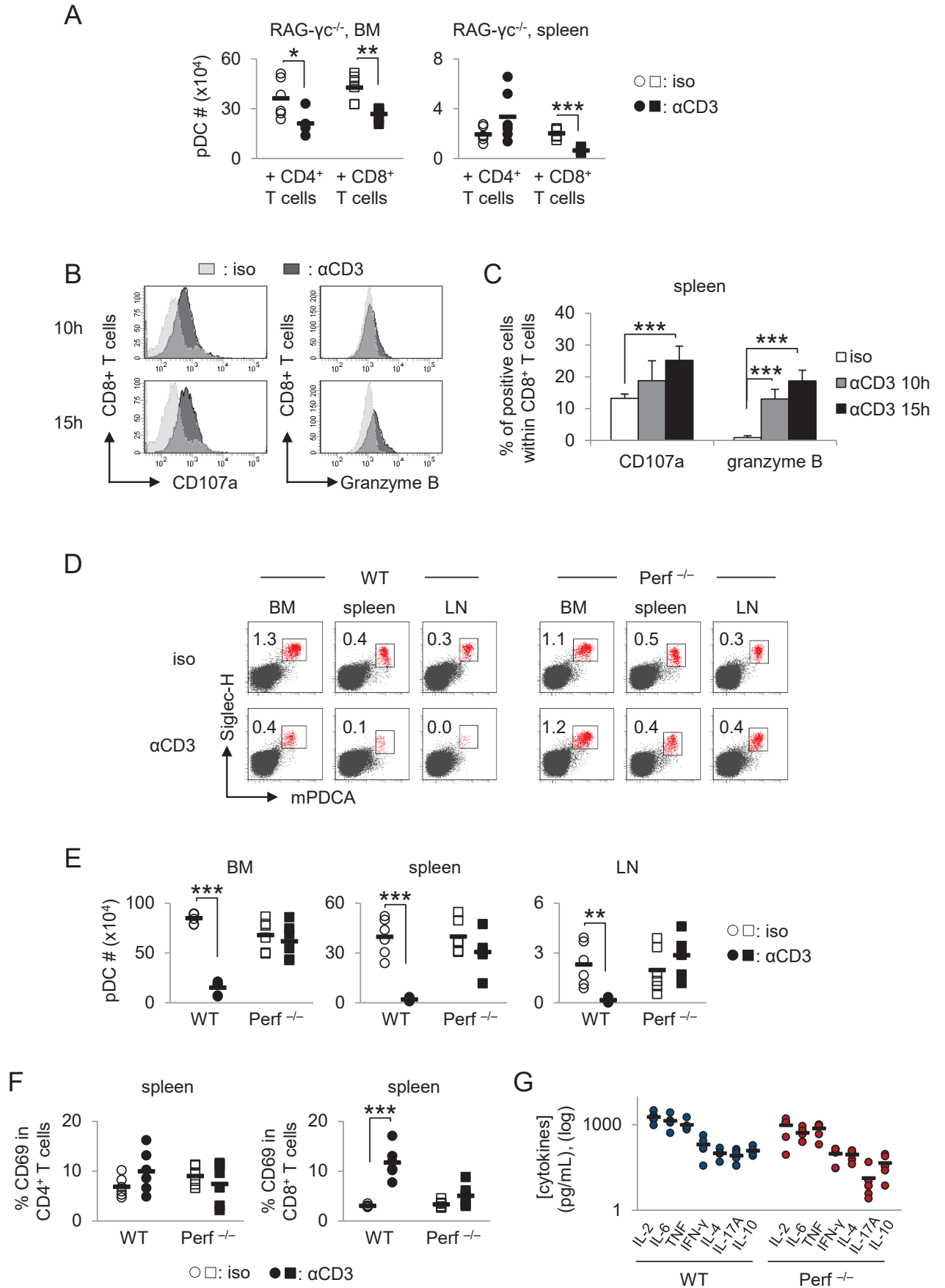


Figure 19. CD8⁺ T cells kill plasmacytoid dendritic cells during sterile inflammation through the perforin pathway

(A) Plasmacytoid DC were analyzed by FACS in the BM, spleen and LN of CD4⁺ or CD8⁺ T cell-reconstituted RAG- γ c^{-/-} mice 4 days after α CD3 or iso mAb treatment. Total numbers of pDC from individual mice are given plus mean (n=6 mice per group) and pooled from two independent experiments. * $=p < 0.05$, ** $=p < 0.01$, *** $=p < 0.001$ (unpaired Student t test). (B and C) Expression of CD107a and granzyme B were evaluated on CD8⁺ T cells in the spleen of WT mice, 10 and 15 h after α CD3 or iso mAb injection. Representative dot plots are shown in (B), and percentages pooled from two independent experiments (n=6 mice per group) are depicted in (C) as the mean \pm SEM. ** $=p < 0.01$, *** $=p < 0.001$ (ANOVA test). (D-F) FACS analysis of Siglec-H⁺mPDCA⁺ pDC in BM, spleen and LN of WT and Perf^{-/-} mice 4 days after α CD3 or iso mAb treatment. Representative dot plots with pDC percentages are shown in (D). Total numbers of pDC in BM, spleen and LN (E), and expression of CD69 in CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the spleen (F) from individual mice are given plus mean (n=6 mice per group) and pooled from two independent experiments. ** $=p < 0.01$, *** $=p < 0.001$ (unpaired Student t test). (G) IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ , IL-6, IL-4 and IL-2 levels were quantified in the plasma of previous mice shown in (E), 90 min after α CD3 or iso mAb treatment. Data are given as individual mice plus mean (n=6 mice per group) and pooled from two independent experiments.

DISCUSSION

In the context of sterile inflammation in which T cells are strongly activated, we observed the death of pDC. Using CD3 injection to model self-limiting sterile inflammation, the mechanism responsible for pDC depletion is dependent on activated CD8⁺ T cells, and more specifically on the CD8⁺ T cell-dependent perforin pathway. This negative control of pDC survival in an inflammatory environment appears similar to the negative feedback described to control cDC survival (16, 19). In addition to the type-I IFN negative control of pDC in viral situations (1), this IFN-I-independent mechanism regulating pDC survival during acute inflammation must prevent from uncontrolled inflammation and autoimmune pathology development.

In mice injected with CD3, we identified profound pDC depletion in lymphoid organs BM, spleen and LN, extended to other tissues. Indeed, pDC have the potential to migrate in different organs upon inflammation-induced activation, such as the intestine (39), or the skin (40). However, during a systemic inflammation associated with massive T cell activation, such as after CD3 injection or in the context of GvHD, pDC survival is affected independently of their location. Apoptosis is early triggered in pDC in such settings since as soon as 10 h after CD3 injection, pDC start to decline and demonstrate executioner caspase activation at this early time.

Injection of CD3 induces a cytokine storm through its mitogenic effect (41), and could target pDC through its Fc part. Our data clearly demonstrate that neither inflammatory cytokines, nor IFN-I, was associated with pDC death. The death of pDC is independent of the MyD88 and the Fc/FcR signaling pathways. Interestingly, the CD3-dependent mitogenic effect is necessary for pDC depletion since CD8⁺ T cells need CD3 crosslinking for their activation. Indeed, when we used FcR- $\gamma^{-/-}$ mice, we observe a normal pDC survival despite CD3 injection. When the crosslinking was restored in FcR- $\gamma^{-/-}$ /WT chimeric mice, CD8⁺ T cells were activated and pDC survival damped, again. We also demonstrate in different GvHD models where T cells are strongly activated the limited pDC survival. In the “parent into F1” transfer GvHD model, the direct alloreactivity could be responsible for recipient pDC depletion. In contrast, the loss of pDC observed in the second GvHD model with irradiation, where the inflammatory disease was triggered by highly activated T cells, pDC depletion could not be the result of alloreactivity. In addition, activation of T cells by their TCR using SEA also induces a decrease of pDC numbers. We were surprised that the cytokine storm was not responsible for reducing pDC survival. In the inflammatory settings studied here, CD3-induced, GvHD, SEA, we consistently observed an inflammatory background attested by T cell activation and high levels of TNF in the sera of mice (data not shown) associated with few pDC survival. CD3 treatment is associated with the secretion of a large amount of several pro-inflammatory cytokines (42). Among these cytokines,

IFN- γ , by its function of inflammatory response initiation (19), and TNF, by its involvement in triggering apoptosis through TNFR (19, 35), could explain the pDC depletion. Indeed, pDC express both TNFR1 and 2 (data not shown). However, when specific neutralizing antibodies or a broad cytokine inhibitor, such as CsA, were used, pDC survival was still strongly affected.

Whereas previous studies have described CD8⁺ T cells as the predominant type of cells controlling cDC life span during inflammation (19), our study shows for the first time that this mechanism is also true for controlling pDC survival and that this could happen independently of viral infection or antigen presentation. Indeed, we demonstrate here that CD8⁺ T cells, once activated, are the main cells inducing pDC death. Nevertheless, we did not investigate the role of NK cells in this depletion since NK cells could participate in controlling pDC survival. NK cells might assist CD8⁺ T cells in this regulatory mechanism, but CD8⁺ T cells by themselves demonstrate excellent skills to exert this task as observed in RAG- γ c^{-/-} reconstituted with T cells or CD8⁺ T cells. Our data suggest that CD8⁺ T cells are the main effector cells controlling pDC survival during acute inflammation associated with massive T cell activation.

The role of perforin in the control of pDC survival is in line with previous work that described perforin pathway as one of the effector that can control cDC survival (11, 19). Fas/FasL signaling pathway was also involved in this feedback loop mechanism to trigger apoptosis in cDC and prevent inflammatory disorders and auto-immunity development (12, 19). In our experiments, we were not able to observe FasL expression on CD8⁺ T cells concomitantly to granzyme B expression (data not shown). However, Fas expression by pDC was described after TLR or IFN-I signaling (12). Thus, it would be interesting to confirm Fas/FasL involvement using *lpr* deficient mice treated with CD3.

We do not evaluate how pDC persistence, in absence of CD8⁺ T cell control, would shape the inflammatory response behavior. In fact, an accumulation of pDC was observed in *perf*^{-/-}DC-Fas^{-/-} mice (19), and it would be interesting to investigate in infected *Perf*^{-/-} mice, pDC behavior and IFN-I levels. Indeed, this situation might be of importance in several autoimmune diseases associated with IFN-I signature, such as SLE (43) and psoriasis (8). Interestingly, CD8⁺ T cells demonstrated a higher expression of perforin and granzyme B in SLE patient (44). Moreover in this context, CD8⁺ T cell activation is correlated with the disease activity and dependent of the IFN-I. Since pDC tend to be reduced in the blood of SLE patient (45), perforin-dependent depletion of pDC could be a control mechanism to avoid over inflammation. However several studies in SLE have shown that pDC were detected in the skin (45, 46). The recruitment of pDC in the skin was also observed in psoriasis lesion (47) and demonstrated responsible for driving psoriatic inflammation (8). It would be of interest to evaluate the CD3 therapeutic effect, or

eventually to activate the cytotoxic function of CD8⁺ T cells to reduce pDC numbers in IFN-I-dependent disorders, like SLE or psoriasis.

pDC are describe as versatile cells that can orientate adaptive immune response toward inflammation or tolerance depending of the ronment (5). In the context of sterile inflammation, pDC persistence might be deleterious and favor immune dysregulation. Therefore, the default of CD8⁺ T cells in producing perforin might favor pDC survival and the induction inflammatory disorders of autoimmune response. We therefore propose that during sterile inflammation, CD8⁺ T cells through the perforin pathway regulate pDC and consequently the inflammatory response driven by pDC. This mechanism might also participate to the control of inflammation during several other inflammatory situations, such as infection. It would be then possible to take advantage of this mechanism and target the effector CD8⁺ T cells to control pDC-dependent inflammatory disorders.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank L. Chatenoud (Hôpital Necker-Enfants Malades) for providing us with the anti-CD3 antibody hybridoma and her expertise, P. Bruhns (Institut Pasteur) for FcR- γ chain^{-/-} mice, B. Ryffel (CNRS-UMR7355) for TNFR1^{-/-} mice, B. Salomon (la Pitié-Salpêtrière) for TNFR2^{-/-} mice, S. Akira (CRCL) for MyD88^{-/-}, M. Dalod (CIML) for IFNAR^{-/-} and T. Walzer (INSERM U1111-CNRS UMR5308) for Perf^{-/-} mice.

REFERENCES

1. Swiecki, M., Y. Wang, W. Vermi, S. Gilfillan, R. D. Schreiber, and M. Colonna. 2011. Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *The Journal of experimental medicine* 208: 2367-2374.
2. Villadangos, J. A., and L. Young. 2008. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 29: 352-361.
3. Krug, A., R. Veeraswamy, A. Pekosz, O. Kanagawa, E. R. Unanue, M. Colonna, and M. Cella. 2003. Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *The Journal of experimental medicine* 197: 899-906.
4. Fonteneau, J. F., M. Gilliet, M. Larsson, I. Dasilva, C. Munz, Y. J. Liu, and N. Bhardwaj. 2003. Activation of influenza virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 101: 3520-3526.
5. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y. J. Liu. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature immunology* 5: 1219-1226.
6. Trinchieri, G. 2010. Type I interferon: friend or foe? *The Journal of experimental medicine* 207: 2053-2063.
7. Rowland, S. L., J. M. Riggs, S. Gilfillan, M. Bugatti, W. Vermi, R. Kolbeck, E. R. Unanue, M. A. Sanjuan, and M. Colonna. 2014. Early, transient depletion of plasmacytoid dendritic cells ameliorates autoimmunity in a lupus model. *The Journal of experimental medicine* 211: 1977-1991.
8. Nestle, F. O., C. Conrad, A. Tun-Kyi, B. Homey, M. Gombert, O. Boyman, G. Burg, Y. J. Liu, and M. Gilliet. 2005. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *The Journal of experimental medicine* 202: 135-143.
9. Glitzner, E., A. Korosec, P. M. Brunner, B. Drobits, N. Amberg, H. B. Schonhaler, T. Kopp, E. F. Wagner, G. Stingl, M. Holcman, and M. Sibilica. 2014. Specific roles for dendritic cell subsets during initiation and progression of psoriasis. *EMBO molecular medicine* 6: 1312-1327.
10. Wang, J., L. Zheng, A. Lobito, F. K. Chan, J. Dale, M. Sneller, X. Yao, J. M. Puck, S. E. Straus, and M. J. Lenardo. 1999. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98: 47-58.
11. Chen, M., Y. H. Wang, Y. Wang, L. Huang, H. Sandoval, Y. J. Liu, and J. Wang. 2006. Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science* 311: 1160-1164.
12. Stranges, P. B., J. Watson, C. J. Cooper, C. M. Choisy-Rossi, A. C. Stonebraker, R. A. Beighton, H. Hartig, J. P. Sundberg, S. Servick, G. Kaufmann, P. J. Fink, and A. V. Chervonsky. 2007. Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity* 26: 629-641.
13. Guarda, G., M. Hons, S. F. Soriano, A. Y. Huang, R. Polley, A. Martin-Fontecha, J. V. Stein, R. N. Germain, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2007. L-selectin-negative CCR7⁻ effector and memory CD8⁺ T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells. *Nature immunology* 8: 743-752.
14. Badovinac, V. P., A. R. Tvinnereim, and J. T. Harty. 2000. Regulation of antigen-specific CD8⁺ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science* 290: 1354-1358.
15. Badovinac, V. P., B. B. Porter, and J. T. Harty. 2004. CD8⁺ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nature immunology* 5: 809-817.
16. Yang, J., S. P. Huck, R. S. McHugh, I. F. Hermans, and F. Ronchese. 2006. Perforin-dependent elimination of dendritic cells regulates the expansion of antigen-specific CD8⁺ T cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 147-152.
17. Jordan, M. B., D. Hildeman, J. Kappler, and P. Marrack. 2004. An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8⁺ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood* 104: 735-743.
18. Matloubian, M., M. Suresh, A. Glass, M. Galvan, K. Chow, J. K. Whitmire, C. M. Walsh, W. R. Clark, and R. Ahmed. 1999. A role for perforin in downregulating T-cell responses during chronic viral infection. *Journal of virology* 73: 2527-2536.
19. Chen, M., K. Felix, and J. Wang. 2012. Critical role for perforin and Fas-dependent killing of dendritic cells in the control of inflammation. *Blood* 119: 127-136.
20. Hermans, I. F., D. S. Ritchie, J. Yang, J. M. Roberts, and F. Ronchese. 2000. CD8⁺ T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity. *J Immunol* 164: 3095-3101.
21. Boissonnas, A., A. Scholer-Dahirel, V. Simon-Blancal, L. Pace, F. Valet, A. Kissenpfennig, T. Sparwasser, B. Malissen, L. Fetler, and S. Amigorena. 2010. Foxp3⁺ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* 32: 266-278.

22. Hakim, F., D. H. Fowler, G. M. Shearer, and R. E. Gress. 2001. Animal models of acute and chronic graft-versus-host disease. *Current protocols in immunology* / edited by John E. Coligan ... [et al.] Chapter 4: Unit 4.3.
23. Cooke, K. R., L. Kobzik, T. R. Martin, J. Brewer, J. Delmonte, Jr., J. M. Crawford, and J. L. Ferrara. 1996. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 88: 3230-3239.
24. Chatenoud, L., C. Legendre, C. Ferran, J. F. Bach, and H. Kreis. 1991. Corticosteroid inhibition of the OKT3-induced cytokine-related syndrome--dosage and kinetics prerequisites. *Transplantation* 51: 334-338.
25. Perruche, S., P. Zhang, T. Maruyama, J. A. Bluestone, P. Saas, and W. Chen. 2009. Lethal effect of CD3-specific antibody in mice deficient in TGF-beta1 by uncontrolled flu-like syndrome. *J Immunol* 183: 953-961.
26. Perruche, S., P. Zhang, Y. Liu, P. Saas, J. A. Bluestone, and W. Chen. 2008. CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nat Med* 14: 528-535.
27. Chatenoud, L. 1993. OKT3-induced cytokine-release syndrome: prevention effect of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody. *Transplantation proceedings* 25: 47-51.
28. Takai, T., M. Li, D. Sylvestre, R. Clynes, and J. V. Ravetch. 1994. FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 76: 519-529.
29. Ferran, C., M. Dy, K. Sheehan, R. Schreiber, G. Grau, J. Bluestone, J. F. Bach, and L. Chatenoud. 1991. Cascade modulation by anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody of interferon-gamma, interleukin 3 and interleukin 6 release after triggering of the CD3/T cell receptor activation pathway. *Eur J Immunol* 21: 2349-2353.
30. Esplugues, E., S. Huber, N. Gagliani, A. E. Hauser, T. Town, Y. Y. Wan, W. O'Connor, Jr., A. Rongvaux, N. Van Rooijen, A. M. Haberman, Y. Iwakura, V. K. Kuchroo, J. K. Kolls, J. A. Bluestone, K. C. Herold, and R. A. Flavell. 2011. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature* 475: 514-518.
31. Bonnefoy, F., S. Perruche, M. Couturier, A. Sedrati, Y. Sun, P. Tiberghien, B. Gaugler, and P. Saas. 2011. Plasmacytoid dendritic cells play a major role in apoptotic leukocyte-induced immune modulation. *J Immunol* 186: 5696-5705.
32. Mehindate, K., J. Thibodeau, M. Dohlsten, T. Kalland, R. P. Sekaly, and W. Mourad. 1995. Cross-linking of major histocompatibility complex class II molecules by staphylococcal enterotoxin A superantigen is a requirement for inflammatory cytokine gene expression. *The Journal of experimental medicine* 182: 1573-1577.
33. Ferran, C., F. Dautry, S. Merite, K. Sheehan, R. Schreiber, G. Grau, J. F. Bach, and L. Chatenoud. 1994. Anti-tumor necrosis factor modulates anti-CD3-triggered T cell cytokine gene expression in vivo. *J Clin Invest* 93: 2189-2196.
34. Ferrara, J. L., J. E. Levine, P. Reddy, and E. Holler. 2009. Graft-versus-host disease. *Lancet* 373: 1550-1561.
35. Aggarwal, B. B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology* 3: 745-756.
36. Brenner, D., H. Blaser, and T. W. Mak. 2015. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nature reviews. Immunology* 15: 362-374.
37. Voskoboinik, I., J. C. Whisstock, and J. A. Trapani. 2015. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature reviews. Immunology*.
38. Shi, L., R. P. Kraut, R. Aebbersold, and A. H. Greenberg. 1992. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *The Journal of experimental medicine* 175: 553-566.
39. Wendland, M., N. Czeloth, N. Mach, B. Malissen, E. Kremmer, O. Pabst, and R. Forster. 2007. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 6347-6352.
40. Vermi, W., E. Riboldi, V. Wittamer, F. Gentili, W. Luini, S. Marrelli, A. Vecchi, J. D. Franssen, D. Communi, L. Massardi, M. Sironi, A. Mantovani, M. Parmentier, F. Facchetti, and S. Sozzani. 2005. Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *The Journal of experimental medicine* 201: 509-515.
41. Hirsch, R., R. E. Gress, D. H. Pluznik, M. Eckhaus, and J. A. Bluestone. 1989. Effects of in vivo administration of anti-CD3 monoclonal antibody on T cell function in mice. II. In vivo activation of T cells. *J Immunol* 142: 737-743.
42. Ferran, C., K. Sheehan, M. Dy, R. Schreiber, S. Merite, P. Landais, L. H. Noel, G. Grau, J. Bluestone, J. F. Bach, and L. Chatenoud. 1990. Cytokine-related syndrome following injection of anti-CD3 monoclonal antibody: further evidence for transient in vivo T cell

activation. *European journal of immunology* 20: 509-515.

43. Bennett, L., A. K. Palucka, E. Arce, V. Cantrell, J. Borvak, J. Banchereau, and V. Pascual. 2003. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *The Journal of experimental medicine* 197: 711-723.

44. Blanco, P., V. Pitard, J. F. Viallard, J. L. Taupin, J. L. Pellegrin, and J. F. Moreau. 2005. Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 52: 201-211.

45. Cederblad, B., S. Blomberg, H. Vallin, A. Perers, G. V. Alm, and L. Ronnblom. 1998. Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of circulating natural interferon-alpha- producing cells. *Journal of autoimmunity* 11: 465-470.

46. Farkas, L., K. Beiske, F. Lund-Johansen, P. Brandtzaeg, and F. L. Jahnsen. 2001. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *The American journal of pathology* 159: 237-243.

47. Albanesi, C., C. Scarponi, S. Pallotta, R. Daniele, D. Bosisio, S. Madonna, P. Fortugno, S. Gonzalvo-Feo, J. D. Franssen, M. Parmentier, O. De Pita, G. Girolomoni, and S. Sozzani. 2009. Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *The Journal of experimental medicine* 206: 249-258.

II- Résultats complémentaires

D'autres résultats nous ont permis au cours de cette thèse d'orienter notre recherche mais ils ne sont pas inclus dans les résultats précédents soumis pour publication. Ces travaux sont détaillés ici, après une section « matériel et méthodes » récapitulant les techniques utilisées et non décrites précédemment.

Matériel et méthodes

Souris et traitements

Des souris C57Bl/6, Balb/c, C3H, FvB ainsi que des souris C57Bl/6 congéniques Ly5.1 (CD45.1⁺) ont été obtenues auprès des laboratoires Charles River (Les Oncins, France), et des souris DBA1 auprès des laboratoires Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Les souris transgéniques OTII/RAG^{-/-}, CX3CR1/GFP et BDCA2/DTR proviennent d'élevages présents à l'animalerie. Les souris transgéniques hCD3 ont été gracieusement fournies par L Chatenoud (Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris). Toutes les souris ont été utilisées à un âge compris entre 6 et 12 semaines. Des souris chimériques TNFR1^{-/-}/WT ont été générées en injectant une quantité égale de cellules de la MO de souris TNFR1^{-/-} et WT congéniques Ly5.1 (2,5 x 10⁶ cellules de chaque origine), à des souris C57Bl/6 préalablement conditionnées par irradiation corporelle totale (7,5 Gy, 2,002 Gy/min ; Clinac 2100c medical linear accelerator, Varian Medical System, Palo Alto, CA). Le chimérisme a été contrôlé chez ces souris dans le sang périphérique 2 semaines après greffe, avant l'injection d'Ac α CD3. L'injection de l'Ac α CD3 a été faite en une dose en intraveineuse (i.v.) ou en intrapéritonéale (i.p.) d'un Ac α CD3 (50, 20 ou 5 μ g/souris, clone 145-2C11 ; gracieusement fourni par L Chatenoud (Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris)), ou d'un contrôle isotypique (50 μ g/souris, clone HTK888 ; Biolegend, San Diego, CA). Le traitement des souris hCD3 par l'Ac α CD3 ciblant le CD3 humain s'est fait par l'injection i.p. d'Ac α CD3 humain (50 μ g/souris, clone OKT3 ; eBioscience, Paris, France), ou d'un contrôle isotypique (50 μ g/souris, clone eBM2a ; eBioscience). Le traitement par d'autres Ac ciblant les LT a été réalisé en injectant une dose en i.v. un Ac α CD3 (150 μ g/souris, clone 17A2 ; Biolegend) ou son contrôle isotypique (150 μ g/souris, clone RTK 4530 ; Biolegend), ou en injectant en i.v. un Ac anti-TCR (150 μ g/souris, clone H57-597 ; Biolegend) ou son contrôle isotypique (150 μ g/souris, clone HTK888 ; Biolegend). Des liposomes composés de phosphatidylcholine (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France) et de cholestérol (Sigma-Aldrich) au ratio 6/1, chargés avec du clodronate (2mg) ou du PBS pour les liposomes contrôles, ont été synthétisés au laboratoire et injectés en i.v. (200 μ L) 48 h avant le traitement par l'Ac α CD3, afin de supprimer les phagocytes.

Cytométrie en flux et dosage de cytokines

Les suspensions cellulaires des différents organes lymphoïdes ont été préparées et marquées comme décrit précédemment. Les anticorps supplémentaires qui ont été utilisés ont été obtenus chez Quansys Biosciences (Logan, UT), BD Biosciences (Le Pont de Claix, France), Biolegend, ou eBioscience

(anti-IL-17 [clone eBio17B7], anti-FoxP3 [clone FJK-16s], anti-CD80 [clone 16-10H1], anti-CD86 [clone GL-1], anti-CD40 [clone 3/23], anti-IA/IE [clone M5/114.15.2], anti-IFN- α [clone RMMA.1]). L'Ac utilisé pour marquer le DTR est un anti-hHB-EGF (Ac polyclonal, R&D systems ; Minneapolis, NM). Les marquages intra-cytoplasmiques ont été réalisés à l'aide de la solution de fixation BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) selon les recommandations du fournisseur. Les marquages intra-nucléaires ont été réalisés en utilisant le kit FoxP3 Staining Buffer Set (eBioscience) selon les recommandations du fournisseur. Le TNF a été dosé dans le sérum par ELISA à l'aide du kit Mouse TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!® (eBioscience) selon les recommandations du fournisseur.

Tris et cultures cellulaires

Pour évaluer la capacité des pDC à polariser des LT naïfs, des cocultures ont été réalisées. Des pDC issues de la MO de souris C57Bl/6 ayant reçu l'Ac α CD3 (50 μ g/souris) ou l'Ac isotypique (50 μ g/souris) 10 jours auparavant, ont été extraites et enrichies par tri immunomagnétique (Anti-mPDCA-1 Microbeads mouse ; Miltenyi Biotec, Paris, France) selon les recommandations du fournisseur. Les pDC ont ensuite été mises en culture 24 h à 37°C à raison de 10⁶ cellules/mL en RPMI-1640 complet (RPMI-1640 [Gibco, Saint Aubin, France], 10% de SVF inactivé, 1% de pénicilline/streptomycine, 1% de tampon HEPES, 1% d'acides aminés non essentiels, 0,05 mM de 2- β -mercaptoéthanol). Ensuite, les LT CD4⁺CD25⁻ sont ajoutés au ratio LT/pDC de 2/1, en présence de peptide OVA323-339 (NeoMPS) à 2 μ g/mL pour stimuler les LT. Les LT CD4⁺CD25⁻ naïfs sont isolés à partir du thymus de souris transgéniques OTII/RAG^{-/-} à l'aide d'un tri immunomagnétique (CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit mouse ; Miltenyi Biotec) selon les recommandations du fournisseur. Après 4 jours de co-culture, la polarisation des LT (Th1, Th17 et Treg) est évaluée en cytométrie de flux. Les splénocytes de ces souris traitées pendant 10 jours avec l'Ac α CD3 ou l'Ac isotypique, ont aussi été mis en culture à raison de 10⁶ cellules/mL avec du RPMI-1640 complet pendant 24 h à 37°C en présence ou non de CpG ODN2216 (12 μ g/mL ; Invivogen, Toulouse, France), afin d'évaluer l'effet du traitement par l'Ac α CD3 sur le phénotype des pDC.

Dans le but de reproduire la déplétion des pDC observée *in vivo*, plusieurs protocoles *in vitro* de culture cellulaire ont été évalués. Des splénocytes issus de souris C57Bl/6 seuls ou additionnés de pDC enrichies de la MO (Anti-mPDCA-1 Microbeads mouse ; Miltenyi Biotec) au ratio de 9 splénocytes pour 1 pDC ont été cultivés pendant 24 h à 37°C à raison de 10⁶ cellules/mL en RPMI-1640 complet, et traités avec de l'Ac α CD3 ou de l'Ac isotypique solubles (5 μ g/mL) ou fixés préalablement à la plaque de culture (50 μ g/mL, coatés). Les cultures de splénocytes additionnés de pDC, ont également été traitées avec le plasma de souris (5 μ L) ayant reçu l'Ac α CD3 (50 μ g/souris) ou l'Ac isotypique (50 μ g/souris) 90 min ou 8 h auparavant. Des pDC triées comme précédemment ont également été mises en culture avec des LT triés magnétiquement de la rate de souris C57Bl/6 (Pan T Cell Isolation Kit II ; Miltenyi Biotec), au ratio de 5 ou 1 LT pour 1 pDC, pendant 24 h à 37 °C à raison de 10⁶ cellules/mL en RPMI-1640 complet, et en présence d'IL-3 (10 ng/mL). Pendant toute la durée de la culture, les cellules ont été traitées avec l'Ac

α CD3 ou l'Ac isotypique solubles (5 μ g/mL) ou fixés préalablement à la plaque de culture (10 μ g/mL et 100 μ g/mL, coatés). La fixation des Ac dans les plaques de cultures se fait par pré-incubation des Ac à la concentration précédemment indiquée, pendant 2 h à 37°C dans un tampon (Tris 50 mM (Sigma-Aldrich), pH 9) avant trois rinçages en RPMI 1640 complet. À la fin des 24 h de cultures, le taux de pDC est évalué en cytométrie de flux.

Résultats

Suite à la disparition des pDC dans les organes lymphoïdes après traitement par l'Ac α CD3, nous avons en premier lieu vérifié que ceci était dû à une déplétion des pDC, et non à une perte de marqueurs spécifiques des pDC. Nous avons pu observer que l'injection de l'Ac α CD3 provoquait la disparition de toutes les cellules positives pour les marqueurs classiquement exprimés par les pDC comme mPDCA, SiglecH. De plus les marqueurs exprimés sur les pDC comme CD11c ou encore B220 ne sont également plus retrouvés à la surface de ces cellules (figure 20A). Même s'il semble difficile que l'Ac α CD3 inhibe totalement l'expression de l'ensemble de ces antigènes, nous avons réalisé la même expérience chez des souris transgéniques CX3CR1/GFP et BDCA2/DTR dont l'expression du transgène à la surface des pDC ne pouvait pas être régulée par l'Ac α CD3. Les résultats en cytométrie de flux montrent que les pDC expriment bien ces deux antigènes CX3CR1 et DTR, et que l'injection de l'Ac α CD3 induit également la disparition de ces transgènes (figure 20C et 20D). Ceci confirme que la disparition des pDC lors de l'inflammation aiguë provoquée par l'Ac α CD3 n'est pas induite par la perte de marqueurs de surface. Toujours concernant l'expression de marqueurs par les pDC, une autre hypothèse a été que si les pDC expriment le marqueur CD3, elles pourraient être directement la cible de l'Ac α CD3. Nos données confirment que les pDC n'expriment pas le CD3 à leur surface, et donc que l'Ac α CD3 ne peut pas avoir un effet direct sur ces cellules (figure 20B).

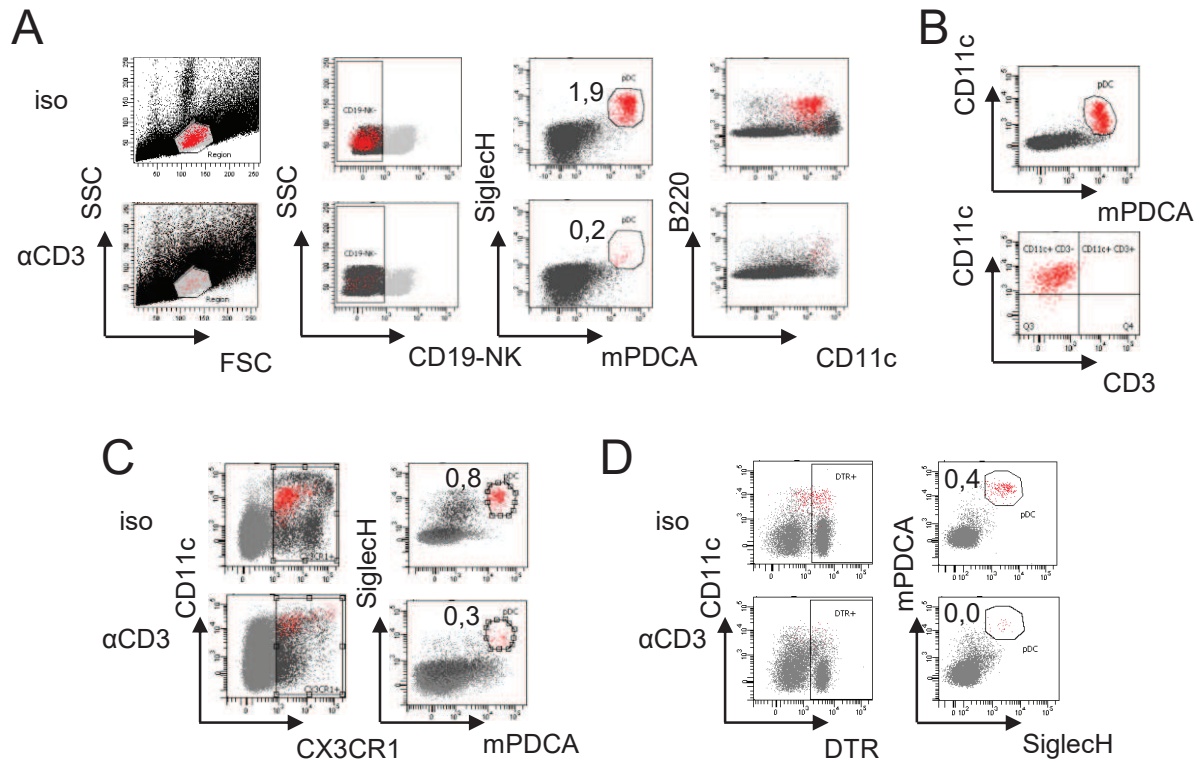


Figure 20 : Les pDC ne sont plus détectables par FACS, 4 jours après l'administration de l'Ac α CD3. L'Ac α CD3 (α CD3 ; clone 145-2C11) ou un Ac isotypique (iso ; clone HTK 888) ont été administrés par voie i.p. à raison de 50 μ g/souris chez des souris naïves (A et B) ou transgéniques CX3CR1/GFP (C) et BDCA2/DTR (D). Les pDC de la rate ont été extraites 4 jours après l'injection, puis marquées et fenêtrées (en rouge) dans la fraction lymphocytaire comme les cellules CD19⁻NK⁻ SiglecH⁺mPDCA⁺CD11c^{int}B220⁺ (A). L'expression de CD3 a été évaluée (B), ainsi que la perte des marqueurs transgéniques CX3CR1 (C) et BDCA2 (D) sur les pDC. Dot plots représentatifs de 3 souris/groupe. Résultats issus de 3 expériences indépendantes.

Étant donné que la voie d'injection va modifier la diffusion de l'Ac α CD3, nous avons testé si une injection i.v pouvait affecter la perte des pDC et également évalué la dose d'Ac nécessaire à cette déperdition. Pour cela des souris ont été injectées avec 50 μ g/souris d'Ac α CD3 en i.p. ou en i.v. ainsi qu'en i.v. avec des doses standards et plus faibles d'Ac (20 et 5 μ g/souris). Les résultats montrent qu'à dose équivalente, l'Ac α CD3 induit une déplétion des pDC similaire dans les trois organes lymphoïdes investigués, la MO, la rate et les ganglions périphériques (GG), indépendamment de la voie d'injection. En revanche, plus la dose d'Ac α CD3 diminue moins la perte des pDC est importante aussi bien en pourcentage qu'en nombre de cellules (figure 21A et 21B). Il semble donc que la perte des pDC dans les organes lymphoïdes est dépendante de la dose injectée mais pas de sa voie d'administration.

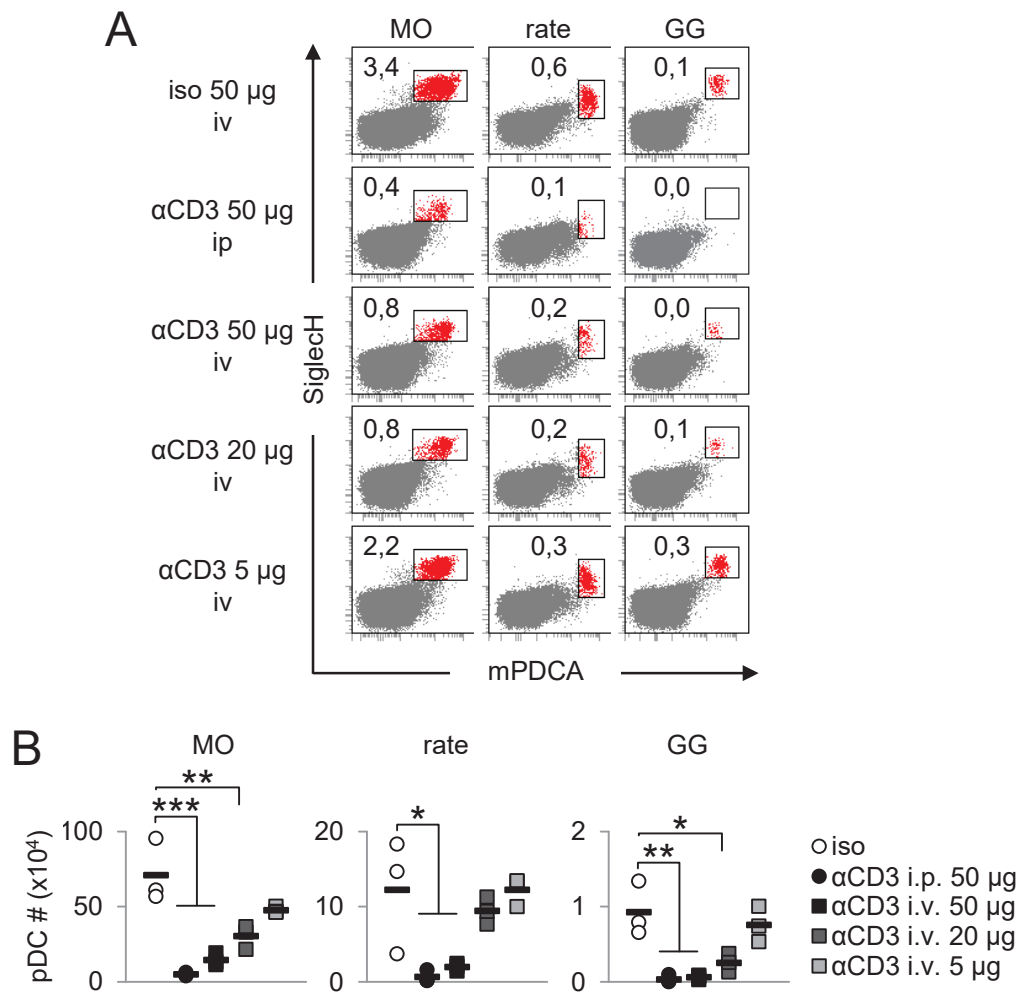


Figure 21 : La déplétion des pDC après injection de l'Ac α CD3 est dépendante de la dose injectée mais pas de sa voie d'injection. Un Ac isotypique (\circ) ou l'Ac α CD3 ont été administrés à des doses de 5 (\blacksquare), 20 (\blacksquare) ou 50 μ g (\blacksquare) en i.v ou 50 μ g en i.p (\bullet) à des souris C57Bl/6. Les pDC de la MO, de la rate et des GG ont été extraites, marquées et analysées en cytométrie de flux 4 jours après l'injection de l'Ac α CD3. Dots plots issus d'une seule expérience montrant les pourcentages de pDC (A), et sous forme de graphique montrant le nombre de pDC par souris et par organe (B). n= 3 souris/groupe ; — moyenne ; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ (test ANOVA).

Au cours du projet, l'orage cytokinique a été l'hypothèse principale pour expliquer la déplétion des pDC après injection de l'Ac α CD3. En effet, nous avons pu voir que l'injection d'un Ac bloquant anti-TNF permettait de limiter en partie la perte des pDC engendrée par l'Ac α CD3 (figure 18). Ne possédant pas de souris déficientes pour les récepteurs au TNF à ce moment de l'étude, nous avons voulu mettre en place un modèle *in vitro* de déplétion des pDC par l'Ac α CD3, qui aurait aussi facilité nos recherches. Pour cela différents protocoles ont été testés. Tout d'abord, des splénocytes seuls ou supplémentés avec des pDC triées de la MO, afin d'augmenter le taux de pDC, ont été mis en culture avec ou sans l'Ac α CD3 (clone 145-2C11) sous forme soluble ou « coatée », mais aucune perte de pDC n'a été observée dans les 24 premières heures de culture (figure 22A et 22B). Nous avons donc essayé d'augmenter le nombre de LT pour induire un orage cytokinique plus important mais sans résultats (figure 22C et 22D). Enfin l'objectif étant d'évaluer à terme l'implication des différents facteurs solubles sécrétés *in vivo* après l'injection de l'Ac α CD3, le plasma de souris traitées avec l'Ac α CD3 a été ajouté à des cultures de splénocytes seuls ou supplémentés en pDC triées de la MO. Les plasmas utilisés ont été prélevés après l'injection de l'Ac α CD3, à 1h30 en particulier, correspondant au pic de l'orage cytokinique post-anti-CD3 (Alegre *et al.*, 1990; Ferran *et al.*, 1990). Les résultats montrent que l'ajout de plasma, quelque soit son origine (souris injectées ou non) provoque une perte des pDC (figure 22E). Au final, nous n'avons pas réussi à mettre au point une méthode de culture cellulaire permettant d'adresser l'influence des cytokines sécrétées suite à l'injection de l'Ac α CD3 sur la survie des pDC.

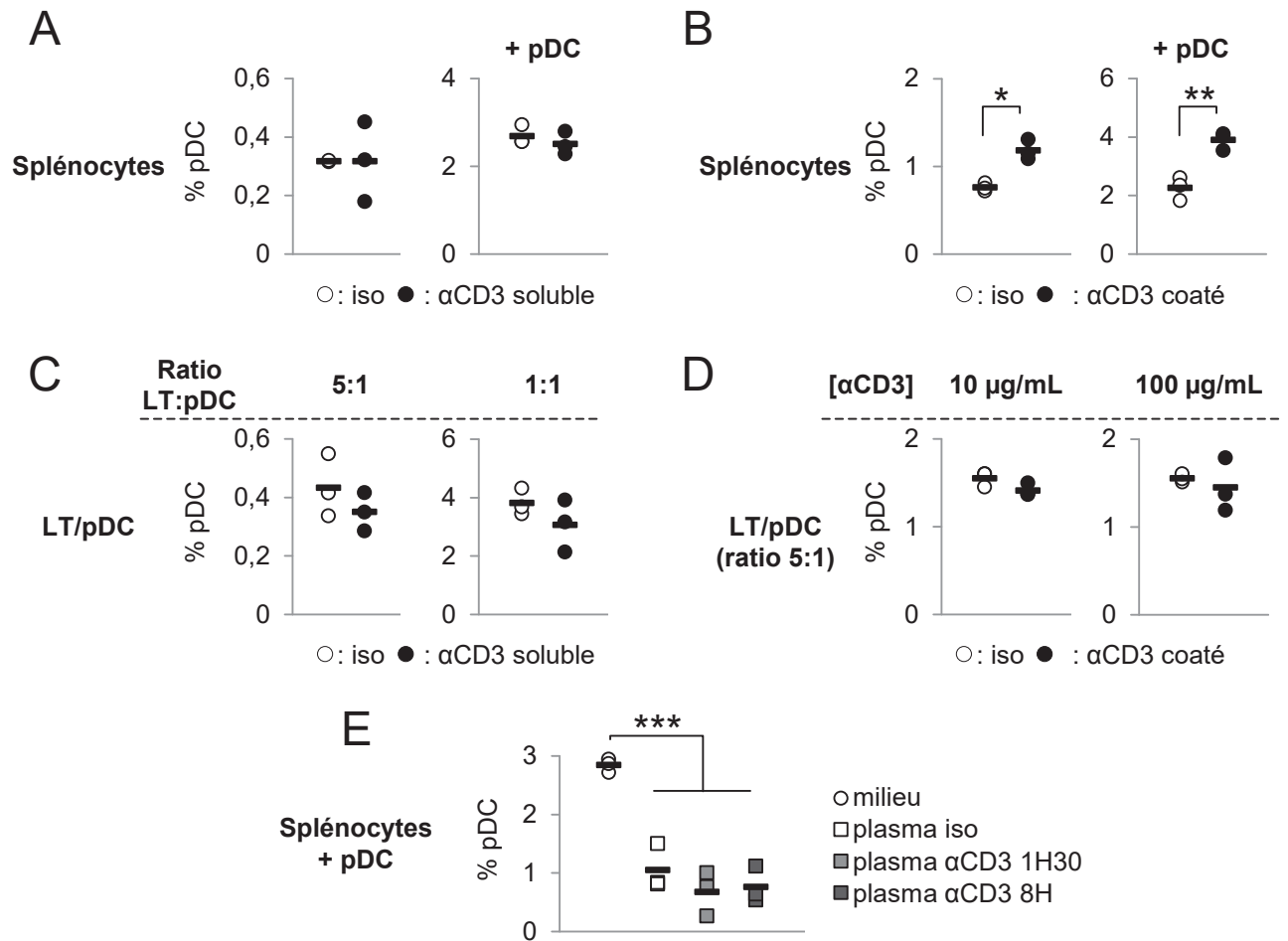


Figure 22 : Mise en place d'un modèle *in vitro* pour évaluer la survie de pDC en présence de l'Ac αCD3. Des splénocytes ont été cultivés seuls ou enrichis en pDC pendant 24 h en présence d'Ac αCD3 (●) ou du contrôle isotypique (○) solubles (5 μg/mL) (A) ou coâtés (50 μg/mL) (B) et le pourcentage de pDC a été déterminé à l'issue de la culture par FACS. Résultats issus d'une expérience représentative parmi 4 montrant les moyennes de triplicats et la moyenne de groupe (—) ; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ (test t de student). Le taux de pDC a aussi été évalué à 24 h dans des cocultures de LT CD3⁺/pDC aux ratios 5:1 et 1:1 en présence d'Ac αCD3 (● ; 5 μg/mL) solubles ou du contrôle isotypique (○ ; 5 μg/mL) (C), ou en présence de 10 ou 100 μg/mL d'Ac αCD3 coaté (●) (D). Résultats issus d'une expérience unique (D) ou représentative parmi 3 (C) montrant les moyennes de triplicats et la moyenne de groupe (—). (E) Le taux de pDC a également été évalué par FACS dans des cultures de 24 h de splénocytes enrichis en pDC triées et en présence de plasma (5 μL) issus de souris ayant reçu l'Ac αCD3 (50 μg/souris) ou l'isotype (□ ; 50 μg/souris) 90 min (■) ou 8 h (■) auparavant. Contrôle = milieu de culture (○). Résultats issus d'une expérience représentative parmi deux. Chaque condition a été réalisée en triplicat ; — = moyenne ; *** = $p < 0,001$ (test t de student).

Pour adresser le rôle du TNF, et notamment si cette cytokine pouvait causer la mort des pDC par une action directe *via* le TNFR1 exprimé à leur surface, le TNFR1 étant associé au domaine de mort TRADD (Brenner *et al.*, 2015), nous sommes retournés chez l'animal et nous avons généré des souris chimériques. Après reconstitution du compartiment hématopoïétique mixte, ces souris présentaient à la fois des pDC WT (CD45.1), et des pDC TNFR1^{-/-} (CD45.2). Chez ces souris chimères, l'injection de l'Ac α CD3 a induit la déplétion de toutes les pDC quelque soit leur origine, montrant qu'aucune action directe du TNF n'intervient directement sur les pDC par l'intermédiaire du TNFR1 (figure 23).

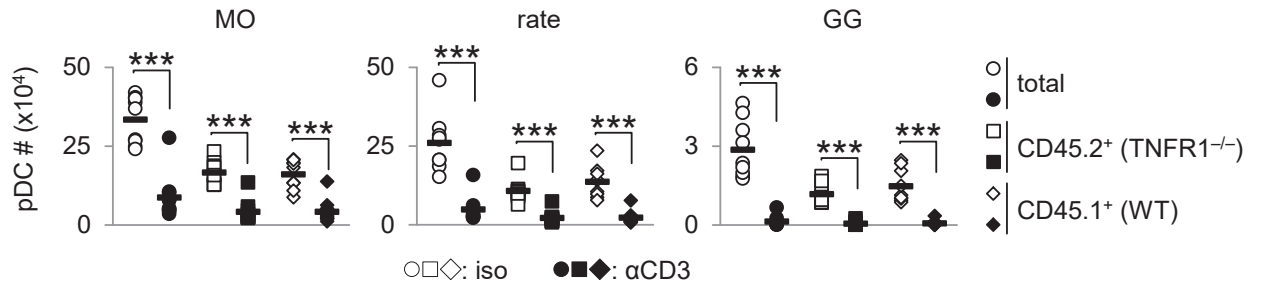


Figure 23 : La déplétion des pDC par l'Ac α CD3 n'implique pas la voie du TNF. Des souris chimériques WT/TNFR1^{-/-} ont reçu soit l'Ac α CD3 (symboles noirs) soit le contrôle isotypique (symboles ouverts) i.p. (50 μ g/souris), et les pDC de la MO, la rate et des GG ont été extraites, marquées et analysées par FACS 4 jours plus tard. Résultats donnés en nombre de pDC par souris et par organe et en fonction de l'origine des pDC (○●, pDC totales ; □■, pDC TNFR1^{-/-} ; ◇◆, pDC WT). Pool de deux expériences indépendantes ; n= 10 souris/groupe ; —= moyenne ; ***=p<0,001 (test t de student).

Si le TNF n'a pas été directement impliqué dans la perte des pDC engendrée par l'Ac α CD3, il est important dans le développement de l'inflammation et de l'orage cytokinique (Ferran *et al.*, 1994; Ferran *et al.*, 1991b; Ferran *et al.*, 1991c). En l'absence d'un modèle *in vitro* fonctionnel, nous avons utilisé le fait que l'Ac α CD3 mitogénique ne provoque pas la même sécrétion de cytokines en fonction des souches traitées, pour voir si un facteur en particulier pouvait expliquer la perte des pDC (Ferran *et al.*, 1991a). Ainsi, sachant que les souris Balb/c sécrètent de fortes quantités d'IFN- γ et d'IL-3 par rapport aux souris C3H suite à l'injection de l'Ac α CD3, une différence dans la diminution des pDC pourrait suggérer l'implication d'une de ces deux cytokines. Cependant, nous avons observé une déplétion similaire des pDC post- α CD3 chez les souris Balb/c et C3H, ainsi que chez les souris de fond C57Bl/6, FvB et DBA1 (figure 24A et 24B).

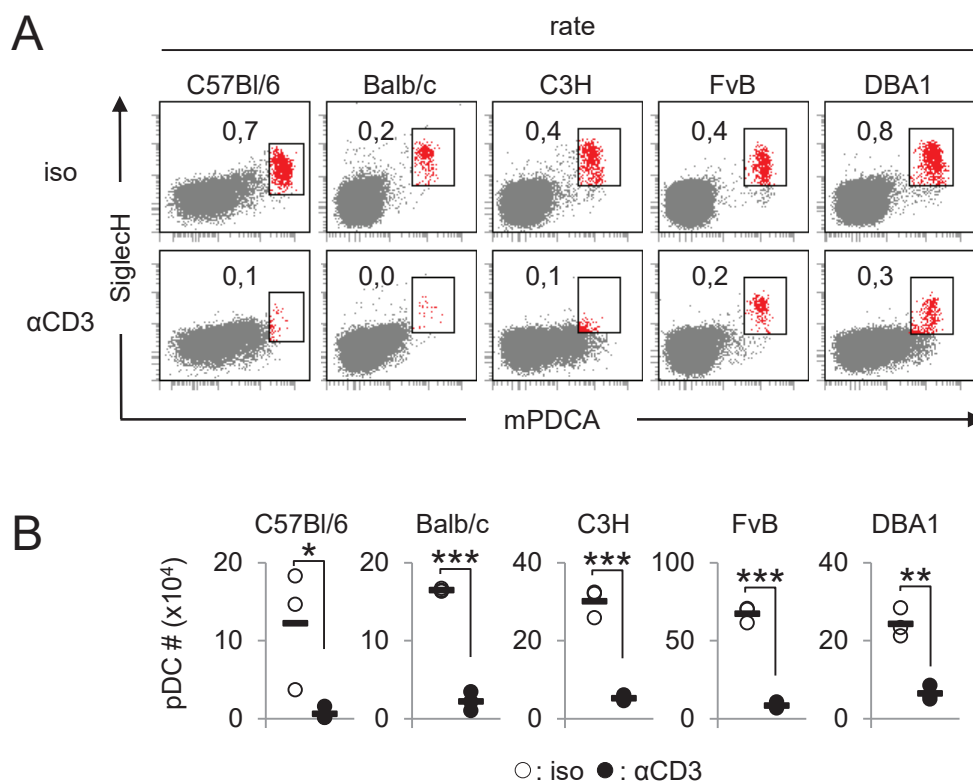


Figure 24 : L'Ac α CD3 induit la déplétion des pDC indépendamment de la souche de souris. Des souris C57Bl/6, Balb/c, C3H, FvB et DBA1 ont reçu en 50 μ g d'Ac α CD3 (●) ou isotype (○) i.p. et les pDC de la rate ont été extraites et analysées par FACS 4 jours plus tard. Résultats issus d'une seule expérience sous forme de dots plots représentatifs montrant les pourcentages de pDC (A) et sous forme d'histogrammes cumulés montrant le nombre de pDC par animal (B). 3 souris/groupe ; — moyenne ; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ (test t de student).

Toujours dans le but d'identifier un facteur soluble qui pourrait expliquer la perte des pDC suite à l'injection de l'Ac α CD3, nous avons tenté d'éliminer une des sources de cytokines produites lors de ce traitement, les phagocytes. En effet, si la plupart des cytokines sécrétées après l'injection de l'Ac α CD3 sont produites par les LT comme le TNF, l'IL-2, l'IL-3 et l'IFN- γ (Ferran *et al.*, 1990), les phagocytes sont capables de sécréter de l'IL-1 β et de l'IL-6 (Goumy *et al.*, 1996), ainsi que du TGF- β (Perruche *et al.*, 2008), limitant par ailleurs la sécrétion de cytokines inflammatoires par ces mêmes phagocytes (Perruche *et al.*, 2009b). Afin d'éliminer les phagocytes, des souris ont été injectées avec des liposomes chargés en clodronate 48 h avant l'injection d'Ac α CD3 (Kleinclauss *et al.*, 2006; Perruche *et al.*, 2008). Malgré l'absence de phagocytes, la perte des pDC est aussi forte que chez des souris ayant reçu les liposomes contrôles (figure 25). Ainsi les phagocytes tels que les macrophages et les cellules dendritiques immatures ne semblent pas impliqués dans l'effet favorisant la déplétion des pDC. D'ailleurs, des résultats supplémentaires vont dans ce sens car l'injection de LPS (activant les phagocytes par la voie du TLR4) n'induit pas de perte des pDC (résultats non figurés).

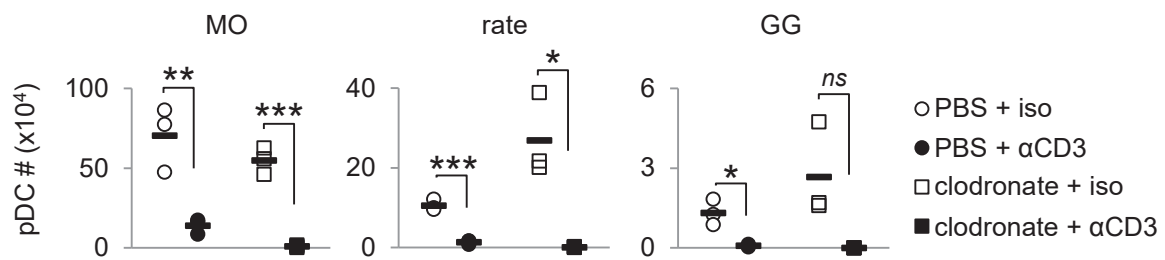


Figure 25 : Les macrophages ne sont pas impliqués dans la survie des pDC post-Ac α CD3. Des souris ont reçu une injection de liposomes chargés en clodronate (■, □) ou en PBS (●, ○) en i.v. (200 μ L/souris) 48 h avant l'injection i.p. de 50 μ g d'Ac α CD3 (●, ■) ou d'Ac isotypique (○, □). Les pDC de la MO, la rate et des GG ont été extraites, marquées et analysées par FACS 4 jours après et dénombrées. Résultats issus d'une seule expérience avec 3 souris/groupe ; — moyenne ; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ (test t de student) ; ns = non significatif.

Après les cytokines inflammatoires, nous avons évalué si le taux de glucocorticoïdes pouvait expliquer la diminution des pDC après le traitement par l'Ac α CD3. Différentes études ont montré que les molécules de cette famille, la corticostérone chez la souris notamment (équivalent du cortisol chez l'Homme), étaient capables d'induire la mort par apoptose des pDC (Lepelletier *et al.*, 2010; Soulier *et al.*, 2013). Dans notre modèle nous avons détecté une élévation des glucocorticoïdes 4 jours post injection (par ELISA), mais aussi bien avec l'Ac α CD3 mitogénique qu'avec l'Ac α CD3 F(ab')₂ qui n'induit pas la déplétion des pDC (Figure 16G), excluant l'implication des glucocorticoïdes.

Nos résultats montrent que l'activation des LT est primordiale dans la perte des pDC (figure 16). L'Ac α CD3 F(ab')₂ ne permet pas une activation des LT suffisante, tout comme l'injection de LPS. De plus d'autres situations inflammatoires comme la GvHD ou l'injection de SEA, d'autres Ac ciblant les LT ont été testés. Tout d'abord, le clone OKT3 a été utilisé chez des souris transgéniques hCD3 exprimant à la fois le CD3 humain et murin. Dans cette expérience l'OKT3 provoque une perte des pDC uniquement dans la MO, contrairement au 145-2C11 qui induit une forte diminution des pDC dans les trois organes lymphoïdes, MO, rate et GG (figure 26A). L'augmentation du marqueur d'activation précoce CD69 sur les LT montre que l'OKT3 comme le 145-2C11 a bien activé ces cellules (figure 26B). Cependant le taux plus faible de TNF sécrété suite à l'injection de l'OKT3 en comparaison du 145-2C11 montre que cette activation est bien plus faible (figure 26C), pouvant expliquer la moindre déplétion des pDC dans les organes lymphoïdes périphériques. Cette plus faible activation des LT peut s'expliquer par l'origine murine de l'OKT3, qui va induire un effet mitogénique plus limité suite à la liaison Fc/Fc γ -R, par rapport au clone 145-2C11 qui est d'origine hamster, donc plus immunogène.

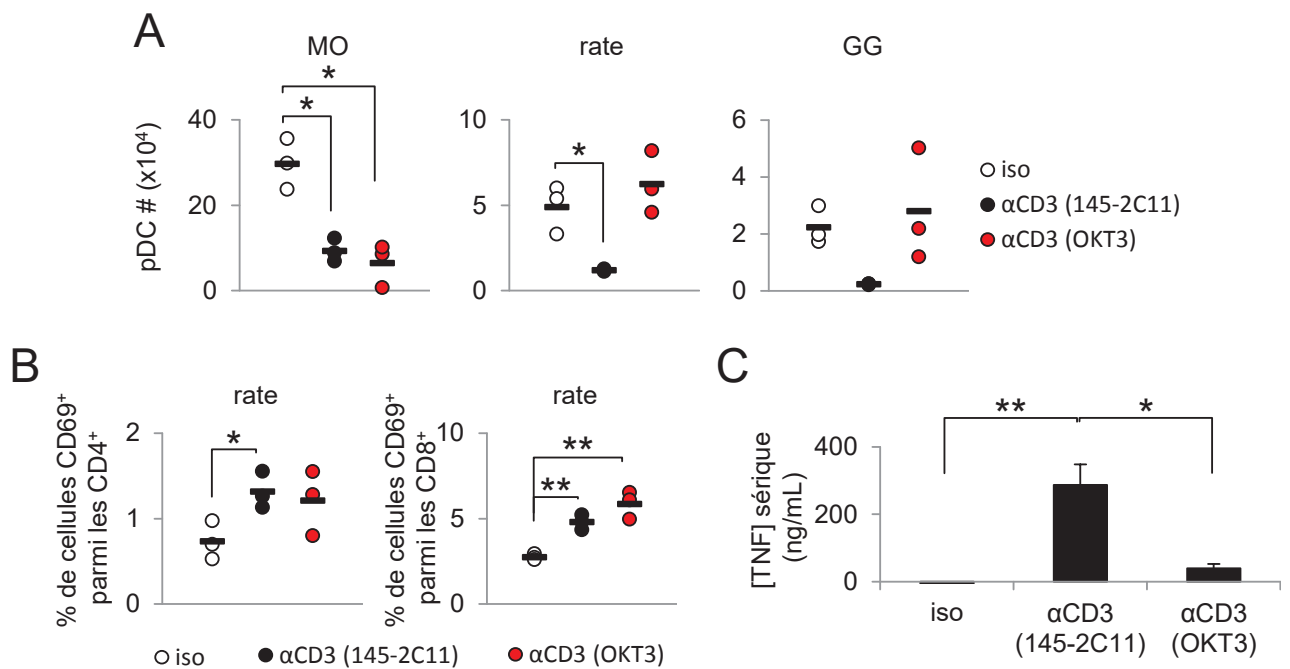


Figure 26 : L'injection d'Ac OKT3 chez des souris transgéniques hCD3 perturbe la survie des pDC. Des souris transgéniques hCD3 (exprimant le CD3 humain dans les LT) ont reçu i.p. 50 μ g d'Ac α CD3 145-2C11 (●) ou OKT3 (●) ou l'isotype (○ ; clone eBM2a). Le nombre de pDC (A) et l'expression de CD69 sur les LT CD4⁺ et CD8⁺ (B) ont été déterminés par FACS, 4 jours après, dans la MO, la rate et les GG. Le TNF a été quantifié dans les sérums de ces souris 90 min après l'injection (C). Résultats issus d'une expérience représentative parmi quatre. n= 3 souris/groupe ; — moyenne ; * = p<0,05 ; ** = p<0,01 (test ANOVA).

Ensuite nous avons utilisé le clone 17A2 produit chez le rat et ciblant la sous-unité δ du CD3 (145-2C11 cible la sous-unité ϵ), puis un Ac ciblant la sous-unité β du TCR (clone H57-597 ; origine hamster). Ces deux Ac ont été injectés en plus grande quantité (150 $\mu\text{g/souris}$) que le l'Ac αCD3 145-2C11 afin d'induire une activation et une déplétion des LT *in vivo* comparable à celle observée avec 50 $\mu\text{g/souris}$ du clone 145-2C11. Nos résultats montrent une perte des pDC similaire entre tous les types d'Ac injectés (figure 27A). De façon surprenante, le clone H57-597 ne parvient pas à faire diminuer le nombre de pDC dans la rate (figure 27A) malgré une expression de CD69 sur les LT équivalente avec ces trois Ac (résultat non figuré). La sécrétion de TNF est cependant diminuée de moitié avec 17A2 et H57-597 par rapport à 145-2C11 (figure 27B). Malgré des voies d'activation différentes des LT, une perte similaire des pDC est observée, validant l'hypothèse qu'une forte inflammation impliquant les LT favorise la diminution des pDC.

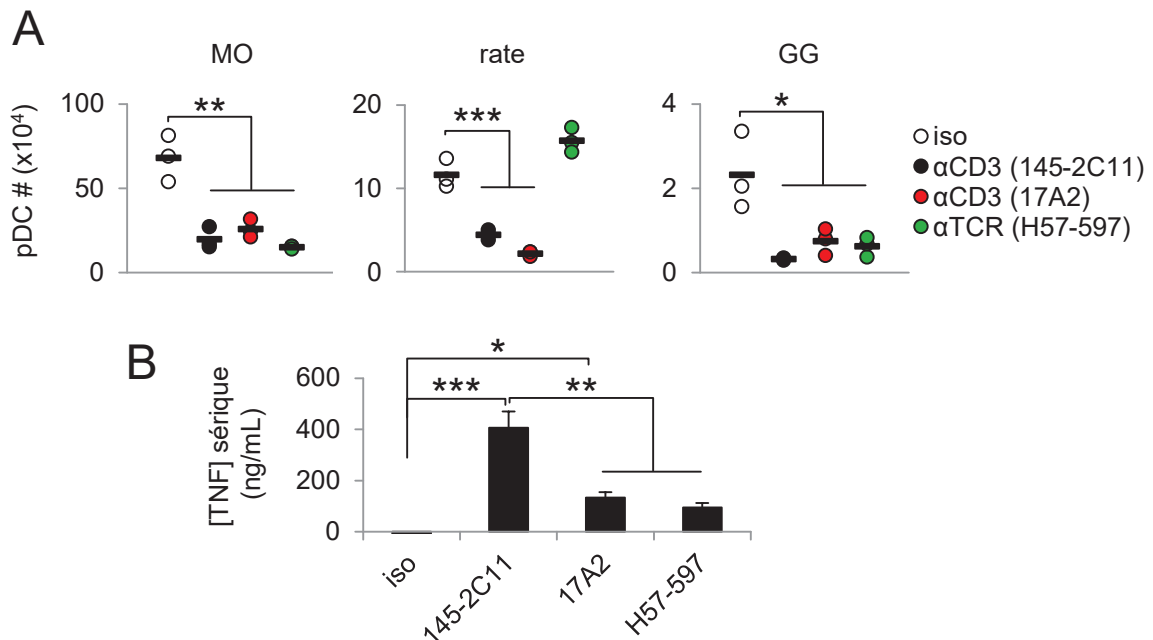


Figure 27 : La survie des pDC est aussi altérée par d'autres Ac induisant l'activation des LT. Des souris C57Bl/6 ont reçu l'Ac αCD3 145-2C11 (● ; 50 $\mu\text{g/souris}$), l'Ac αCD3 17A2 (● ; 150 $\mu\text{g/souris}$), l'Ac αTCR H57-597 (● ; 150 $\mu\text{g/souris}$) ou les contrôles isotypes (○ ; 50 $\mu\text{g/souris}$ du clone HTK888 et 150 $\mu\text{g/souris}$ du clone RTK4530) i.v. Quatre jours après, les pDC de la MO, la rate et des GG ont été extraites, marquées et analysées par FACS puis dénombrées (A) et le taux de TNF sérique déterminé 90 min après injection (B). Résultats issus d'une seule expérience avec 3 souris/groupe ; — moyenne ; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ (test ANOVA).

Plusieurs études ont montré que dans un contexte inflammatoire la survie des cDC peut être régulée par l'intermédiaire du récepteur de mort Fas (Chen *et al.*, 2012b; Stranges *et al.*, 2007). Il est alors possible d'imaginer que l'Ac α CD3, suite à l'activation des LT, induise l'apoptose des pDC par l'intermédiaire des ligands de récepteurs de mort tels que FasL et TRAIL. Cependant, 2 h après l'injection de l'Ac α CD3 145-2C11, aucune augmentation des récepteurs de mort Fas ou DR5 (récepteur de TRAIL) n'a été observée à la surface des pDC, et ce, dans aucun organe lymphoïde (figure 28). De plus, aucune augmentation de FasL et de TRAIL à la surface des LT n'a non plus été relevée (résultats non figurés). Il semble donc que ces voies d'induction de la mort cellulaire ne soient pas responsables de la régulation de la survie des pDC dans ce contexte d'inflammation aiguë.

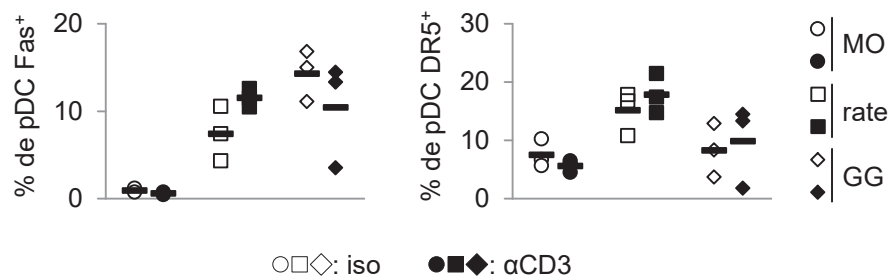


Figure 28 : L'injection d'Ac α CD3 ne favorise pas l'expression des récepteurs de mort Fas et DR5 sur les pDC. L'Ac α CD3 (●■◆ ; 50 μ g/souris) ou l'Ac isotypique (○□◇ ; 50 μ g/souris) ont été injectés i.p. à des souris, et l'expression des récepteurs de mort Fas (graphique de gauche) et DR5 (graphique de droite) a été évaluée sur les pDC de la MO (○,●), de la rate (□,■) et des GG (◇,◆) ex vivo, 2 h après injection. Résultats issus d'une expérience représentative parmi deux. n= 3 souris/groupe ; — moyenne.

La suite de nos travaux a montré l'intervention des CTL et de la voie de la perforine comme responsables de la survie des pDC dans un contexte d'inflammation non virale (figure 19). Malgré l'inflammation induite par l'injection d'Ac α CD3, ce modèle permet également l'étude de la réponse tolérogène (Perruche *et al.*, 2008). En effet après la première phase d'inflammation se met en place une phase résolutive, notamment associée à la phagocytose des LT apoptotiques par les phagocytes et la génération d'un microenvironnement pro-tolérigène. Nous avons montré au laboratoire que les pDC participaient à l'induction de tolérance par les cellules apoptotiques. Nous nous sommes donc intéressés au profil des pDC émergeant après injection de l'Ac α CD3 dans cet environnement pro-tolérigène. Tout d'abord, fonctionnellement, nous avons remarqué que les pDC issues de souris traitées par l'Ac α CD3 10 jours auparavant ont une capacité moindre à maturer en réponse à une stimulation TLR. En effet suite à une stimulation par CpG, les pDC issues des animaux « α CD3 » expriment moins le CD80 et le CMH-II, qu'elles proviennent de la MO ou de la rate (figure 29A). En revanche, ces pDC vont augmenter de manière plus importante l'expression du CD40, notamment dans la rate, un marqueur plutôt impliqué dans l'induction de réponses Th2 sur les pDC (Ito *et al.*, 2004), ainsi que le CD86. De façon intéressante, les pDC émergentes post-Ac α CD3, sécrètent aussi moins d'IFN- α en réponse au CpG, cet effet étant plus marqué quand elles proviennent de la MO (figure 29B). Il semble donc que les pDC au moment de leur

reconstitution sont dans un état de quiescence, où leur capacité à activer des réponses immunitaires est réduite. Cet état pourrait donc soit les favoriser à polariser des LT naïfs vers un profil régulateur et participer ainsi à l'induction de tolérance par l'Ac α CD3, soit les rendre « inertes ». Nous avons donc co-cultivé ces pDC avec des LT naïfs, et observé qu'elles orientaient la polarisation T vers un profil Th1, de la même manière que des pDC « naïves » (figure 29C). D'autres expériences seraient nécessaires pour étudier plus profondément le profil des pDC dans ce contexte post-inflammatoire/tolérigène, et leur capacité à réguler les réponses immunitaires.

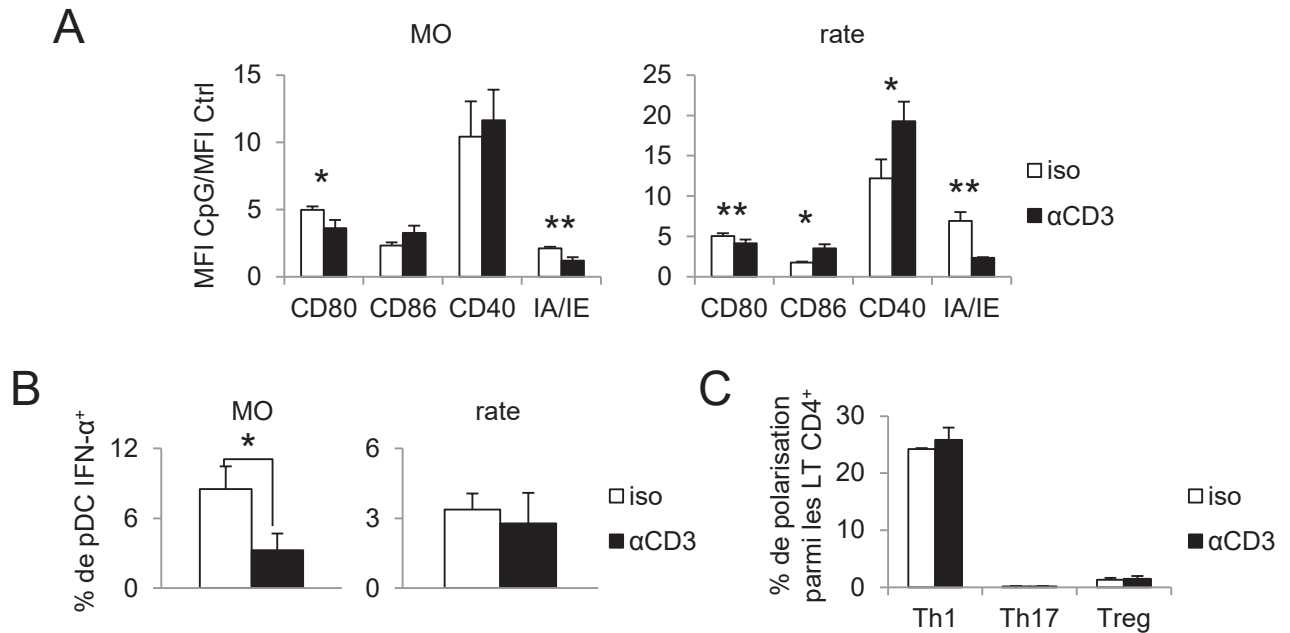


Figure 29 : Les pDC émergentes après injection d'Ac α CD3 démontrent un profil quiescent. Les pDC ont été analysées dans la rate et la MO de souris ayant reçu l'Ac α CD3 (barres noires) ou l'isotype (barres blanches), 10 jours après l'injection pour l'expression des marqueurs CD80, CD86, CD40 et IA/IE (CMH-II) après restimulation ou non par CpG (ODN 2216 ; 12 μ g/mL) (A). Résultats montrant les rapports d'expression des marqueurs des cellules traitées sur les cellules non traitées. La production cellulaire d'IFN- α a été évaluée par FACS en présence de CpG (B). Résultats issus d'une seule expérience avec 4 souris/groupe ; moyenne \pm SEM ; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ (test t de student). Les pDC extraites ont également été co-cultivées avec des LT naïfs CD4⁺CD25⁻ et la polarisation Th1, Th17 et Treg a été évaluée par FACS après 4 jours de culture. Résultats issus d'une seule expérience avec 3 souris/groupe ; moyenne de triplicat \pm SEM.

Discussion

Les pDC sont des cellules spécialisées dans la lutte antivirale de par leur capacité à reconnaître les antigènes viraux par l'intermédiaire de leur TLR7 et TLR9. Cette activation des voies de l'immunité innée va induire une forte sécrétion des IFN-I (Asselin-Paturel *et al.*, 2001; Cella *et al.*, 1999), une famille de cytokines largement impliquée dans le développement de l'inflammation. Les IFN-I vont tout d'abord permettre la transcription de protéines avec une activité antivirale directe permettant la résolution d'infections (Samuel, 2001). Ces cytokines vont également avoir un effet sur d'autres types cellulaires afin de favoriser les mécanismes effecteurs contre les infections virales. Ainsi les IFN-I vont augmenter l'expression du CMH-I par les cellules infectées, ou encore activer les NK favorisant les réponses cytotoxiques. Dans ce contexte d'infection virale il a été démontré que l'activité des pDC était régulée, notamment par le contrôle de leur survie passant par les IFN-I et leur récepteur conduisant à l'apoptose des pDC (Swiecki *et al.*, 2011). Ce mécanisme de rétro-contrôle négatif des pDC permettrait d'éviter qu'elles n'activent trop fortement ou de façon prolongée, ce qui pourrait déboucher sur des désordres immunitaires pouvant aller jusqu'à la survenue de syndromes auto-immuns. Car si les pDC sont spécialisées dans la lutte antivirale, elles sont aussi capables d'activer les voies de l'immunité adaptative et peuvent être à l'origine de maladies auto-immunes. Il a été rapporté que les pDC peuvent en effet intervenir dans la physiopathologie du SLE (Rowland *et al.*, 2014), du psoriasis (Albanesi *et al.*, 2010), de la SEP (Isaksson *et al.*, 2009) ou encore du diabète de type I (Li and McDevitt, 2011). Les pDC participent au déclenchement de ces pathologies en raison de leur activation aberrante par des ADN du soi, qui en condition physiologique n'ont pas accès au compartiment endosomal où se trouvent les TLR7 et TLR9. Dans ce contexte, les pDC vont favoriser des réponses adaptatives inflammatoires de type Th1 et Th17, ou encore la conversion de LB en plasmocytes sécréteurs d'auto-Ac. Les cytokines principales responsables de cette polarisation au profil inflammatoire sont les IFN-I, qui vont être à l'origine de l'augmentation des LT effecteurs auto-réactifs. Alors que dans le contexte de l'infection virale les pDC vont être réduites pour éviter une sur-inflammation, il apparaît que lors du développement de pathologies auto-immunes, les IFN-I ne sont pas en mesure de contrôler leur survie. Il doit donc exister en condition physiologique d'autres mécanismes de régulation des fonctions effectrices des pDC afin d'éviter le développement de syndromes inflammatoires chroniques. Le premier mécanisme permettant d'éviter cette activation anormale des pDC est la compartimentation des TLR au niveau endosomal, empêchant la reconnaissance d'ADN du soi. Il a été montré que certaines molécules comme HMGB1 (Tian *et al.*, 2007) et LL-37 (Diana *et al.*, 2013; Lande *et al.*, 2011) sont capables de faire entrer ces ADN du soi dans le milieu intracellulaire, induisant ainsi l'activation des pDC dans les pathologies auto-immunes. Cependant le mécanisme permettant d'expliquer comment chez les personnes atteintes de syndromes auto-immuns plus que chez d'autres personnes, l'ADN du soi va être capable d'activer de manière incontrôlée les pDC, reste peu clair. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un autre mécanisme permettrait le contrôle des pDC, dans le cas où elles seraient anormalement activées dans un contexte inflammatoire non viral. L'objectif de mes travaux de thèse a donc été de mettre en place un modèle expérimental permettant l'induction d'un état inflammatoire aigu et non viral, afin d'étudier d'éventuels mécanismes de régulation des pDC. Pour cela nous avons choisi

d'utiliser les propriétés de l'Ac α CD3 mitogénique (clone 145-2C11) qui permet de provoquer une forte activation des LT, marquée par la sécrétion d'un grand nombre de cytokines inflammatoires. Dans ce modèle, 4 jours après injection de l'Ac α CD3, nous avons constaté la disparition des pDC dans les organes lymphoïdes. Il est rapidement apparu que les pDC dans ces organes entraient en apoptose quelques heures seulement après l'injection de l'Ac α CD3. Dans ce contexte inflammatoire, les pDC subissent donc une régulation négative par le contrôle de leur survie.

1. L'activation des LT induit la perte des pDC

Afin d'identifier le mécanisme à l'origine de la perte des pDC, nous nous sommes intéressés à l'effet produit par l'injection de l'Ac α CD3 145-2C11. Les cibles de cet Ac mitogénique sont les LT qui vont alors s'activer très fortement sous l'effet de la liaison de la partie spécifique à l'antigène CD3, et de la partie Fc aux Fc γ -R d'autres types cellulaires. Cette activation est effectivement dépendante de la partie Fc de l'Ac α CD3, car en son absence (Ac α CD3 F(ab')₂ par exemple), l'activation des LT n'intervient pas ou est plus faible, et l'orage cytokinique n'est donc pas observé (Alegre *et al.*, 1995; Hirsch *et al.*, 1988). Dans nos expériences, l'utilisation de l'Ac α CD3 F(ab')₂ nous a également permis de voir que les LT ne sont pas activés, et que les pDC n'étaient pas déplétées (figure 16). Ceci suggérerait que la mort des LT induite par l'Ac α CD3 pouvait expliquer la déplétion des pDC, notamment à cause du défaut de production de facteurs nécessaires à la survie des pDC, comme l'IL-3 produite en grande majorité par les LT (Grouard *et al.*, 1997). Néanmoins l'Ac α CD3 F(ab')₂ non déplétant pour les pDC, peut induire l'anergie des LT conduisant à leur mort sans les activer, montrant que cette perte des LT n'est pas préjudiciable pour la survie des pDC. Nous avons confirmé l'importance de cette liaison Fc/Fc γ -R dans l'activation LT en injectant l'Ac α CD3 145-2C11 complet chez des souris Fc γ -R^{-/-}, dans lesquelles l'expression du marqueur d'activation CD69 à la surface des LT n'est pas augmentée en comparaison de souris WT. De plus, comme avec l'Ac α CD3 F(ab')₂, les pDC ne sont pas diminuées après traitement par l'Ac α CD3 chez ces souris. Il est intéressant de noter que le seul Fc γ -R inhibiteur exprimé par les pDC murines est le Fc γ -RIIB, dont le domaine ITIM permettant la transduction du signal intracellulaire est inhibiteur (Guilliams *et al.*, 2014). Par ailleurs, le signal produit par l'engagement du Fc γ -RIIB peut conduire au déclenchement de l'apoptose chez les LB en particulier (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Il est alors possible qu'avec l'Ac α CD3 l'engagement direct de la partie Fc de l'Ac avec le Fc γ -RIIB sur les pDC induise leur mort par apoptose. Cependant l'utilisation de souris chimériques, possédant à la fois des cellules WT et des cellules Fc γ -R^{-/-}, a montré que la liaison directe entre la partie Fc de l'Ac α CD3 et les Fc γ -R des pDC ne provoquait pas la perte des pDC. L'ensemble de ces résultats a finalement clairement montré que seule l'activation des LT était responsable de la déplétion des pDC dans le modèle de l'Ac α CD3 (figure 30).

Dans le but de montrer que cette déplétion des pDC n'était pas uniquement due à l'utilisation spécifique du clone 145-2C11, nous avons tenté de reproduire cet effet en activant directement les LT par d'autres Ac. Ainsi en utilisant des Ac ciblant la sous-unité δ de l'antigène CD3 (clone 17A2), ou encore

par la chaîne β du TCR (clone H57-597), nous avons pu activer les LT, comme en atteste la quantité de TNF détectée dans le plasma des souris (figure 27).

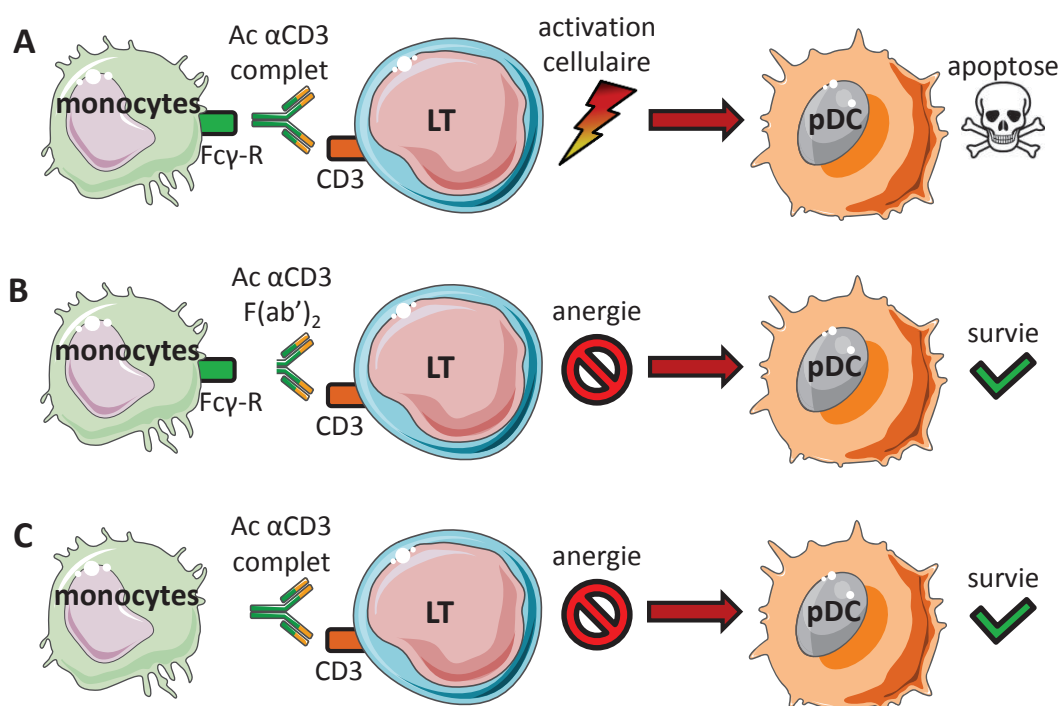


Figure 30 : L'activation des LT par l'Ac α CD3 induit l'apoptose des pDC. (A) La forme complète de l'Ac α CD3 145-2C11 induit l'activation des LT par la liaison de sa partie spécifique à l'antigène CD3, et de sa partie Fc au Fcγ-R d'autres cellules comme les monocytes, le tout induisant l'apoptose des pDC. L'inhibition de la liaison Fc/Fcγ-R par l'absence de la partie Fc de l'Ac α CD3 (B), ou l'absence de Fcγ-R (C) va induire un état anergique des LT limitant l'apoptose des pDC.

Nous avons également injecté le clone OKT3 de l'Ac α CD3 chez des souris transgéniques hCD3 exprimant à la fois le CD3 humain et le CD3 murin (figure 26). Chez ces souris transgéniques, l'OKT3 va activer les LT comme en atteste l'augmentation de l'expression du CD69 à la surface des LT dans la rate. Cependant, la capacité de tous ces Ac ciblant les LT à les activer semble moins forte qu'avec une injection d'Ac α CD3 145-2C11, étant donné la plus faible quantité de TNF retrouvée dans le plasma des souris. Ceci pourrait expliquer que même si les pDC sont diminuées dans la plupart des organes lymphoïdes, cette perte n'est pas observée systématiquement. Ainsi l'OKT3 n'induit la perte des pDC que dans la MO des souris hCD3, et le clone H57-597 n'est pas capable de diminuer les pDC dans la rate alors que le clone 17A2 provoque leur déplétion dans la MO, la rate et les GG. Dans le cas de l'OKT3, cette activation plus faible des LT peut s'expliquer par le fait que cet Ac α CD3 est d'origine murine, limitant sûrement sa capacité à produire un signal activateur aussi robuste par la liaison Fc/Fcγ-R par le 145-2C11 d'origine hamster. Pour l'Ac H57-597 ciblant le TCR, la plus faible activation des LT par rapport à l'Ac α CD3 145-2C11 peut s'expliquer par l'absence de motif intracytoplasmique de type ITAM sur le TCR permettant la transduction d'un signal cellulaire, au contraire de la sous-unité ϵ du CD3. Cependant, alors que les clones OKT3, 17A2 ou H57-597 vont induire une déplétion plus ou moins étendue des pDC, nous n'avons pas été capables de

voir si les LT étaient plus ou moins activés par ces différents Ac. En effet, le taux de TNF plasmatique était similaire après l'injection de ces trois Ac, et l'expression de CD69 en surface était augmentée seulement avec l'OKT3. Le CD69 étant un marqueur d'activation précoce des LT, son augmentation n'est pas constamment observée au moment du sacrifice des souris, 4 jours après le traitement par les Ac. Afin de confirmer une différence dans la force de l'activation des LT entre ces différents traitements, il aurait été judicieux de regarder le taux du CD69 sur les LT dans le sang peu après l'injection des Ac. Néanmoins il semble bien que plus l'activation des LT est forte, plus la déplétion des pDC est étendue. Les données concernant la cinétique de déplétion des pDC montrent que dans les premières heures suivant le traitement par l'Ac α CD3 145-2C11, le nombre de pDC va être réduit dans la rate et les GG avant que celles-ci ne diminuent dans la MO (figure 15F). Ceci montre que plus le nombre de LT activés dans un organe donné est important (rate et GG), plus la survie des pDC est susceptible d'être impactée. Notre hypothèse est que dans le contexte de l'Ac α CD3 mitogénique, l'activation précoce des LT dans la rate et les GG va induire une perte rapide des pDC. Les pDC qui sont produites dans la MO, diminueraient alors plus tardivement dans cet organe sous l'effet de la migration des pDC néoproductes vers la rate et les GG afin de reconstituer la population de pDC dans ces organes. Quand l'activation des LT persiste, ce phénomène se poursuit jusqu'à épuisement des pDC dans tous les organes lymphoïdes. En reprenant l'exemple des Ac OKT3, 17A2 et H57-597, cette migration permettrait d'expliquer la différence de perte des pDC entre les organes. L'Ac α CD3 OKT3 induirait la plus faible activation des LT, il provoquerait donc une déplétion modérée des pDC dans la rate et les GG qui serait compensée par une migration des pDC de la MO, induisant la diminution de ces cellules dans cet organe. Le clone H57-597 induirait une activation des LT plus soutenue que l'OKT3 ce qui provoquerait une déplétion un peu plus profonde des pDC dans la rate et les GG. Dans ce cas, le réservoir de pDC dans la MO s'épuiserait en comblant la perte des pDC dans la rate au détriment d'une repopulation des GG. Enfin le clone 17A2, comme le clone 145-2C11 de l'Ac α CD3, induirait une activation des LT assez forte pour provoquer l'épuisement total du réservoir de pDC dans tous les organes lymphoïdes (hypothèse illustrée dans la figure 31). Dans ce contexte, si les pDC sortent effectivement en masse de la MO pour recoloniser les organes périphériques, il est probable qu'elles n'aient pas toutes le temps de bien maturer. Dans ce cas, il serait possible de vérifier notre hypothèse en regardant si des pDC immatures n'exprimant pas Ly-49Q par exemple sont présentes dans la rate et les GG (Kamogawa-Schifter *et al.*, 2005).

Si la raison permettant d'expliquer la différence de déplétion des pDC entre les organes reste une hypothèse, nos données permettent d'affirmer que l'activation des LT va très fortement influencer la survie des pDC. Dans le cadre de l'utilisation de l'Ac α CD3 mitogénique, la principale conséquence est le déclenchement d'un orage cytokinique de large ampleur, avec la sécrétion de nombreux facteurs solubles pro-inflammatoires comme le TNF, l'IFN- γ , l'IL-2 ou encore l'IL-6 (Alegre *et al.*, 1991; Ferran *et al.*, 1990).

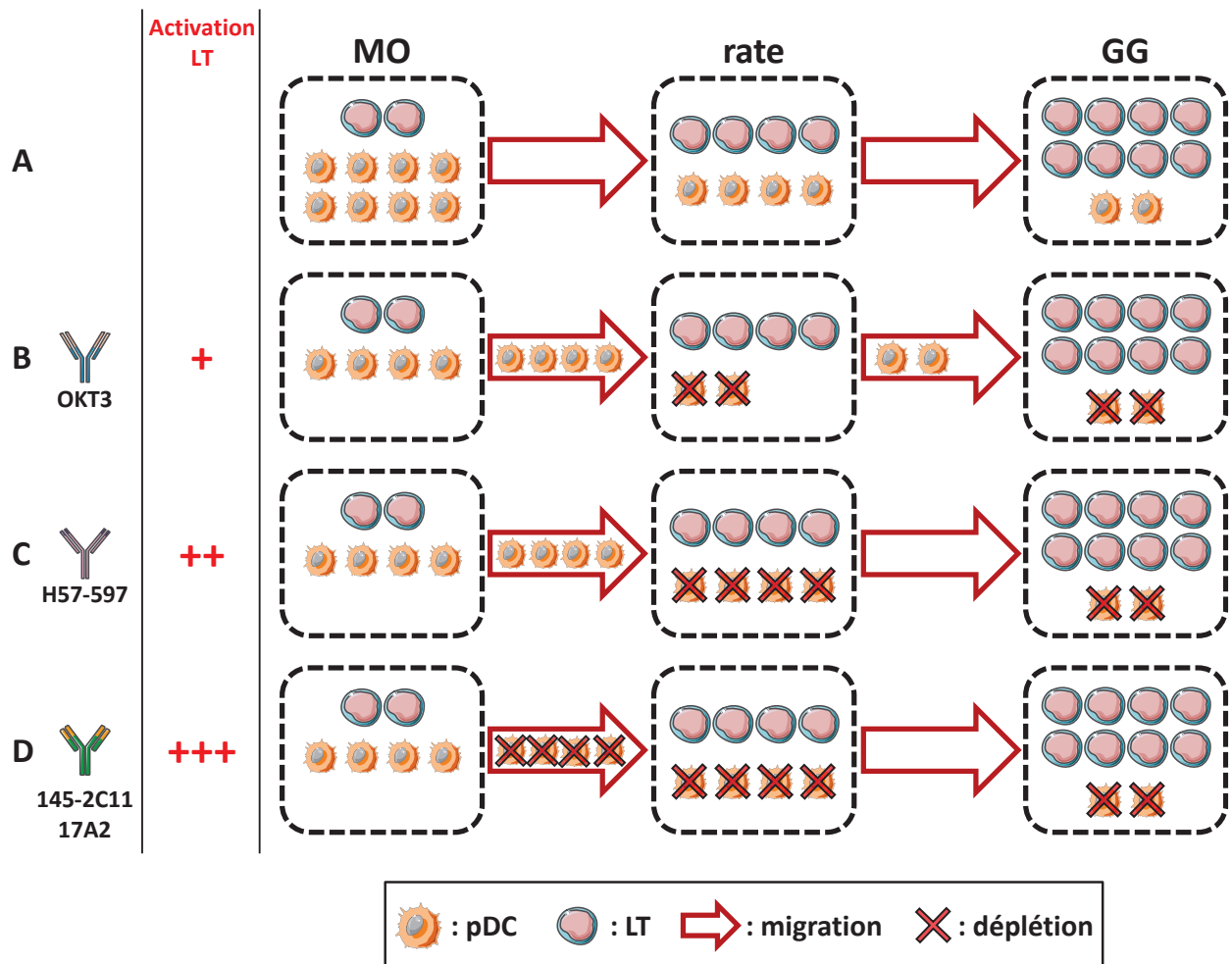


Figure 31 : Rapport entre l'intensité d'activation des LT et l'ampleur de la déplétion des pDC. (A) En condition physiologique les pDC sont présentes en grande quantité dans la MO où elles sont produites. On les retrouve matures dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate et les GG en quantité plus limitée que dans la MO. (B) Lors d'une activation modérée des LT (injection de l'Ac α CD3 OKT3 chez des souris transgéniques hCD3), la déplétion des pDC sera limitée à la rate et les GG. Les pDC de ces organes seront reconstituées grâce à la migration des pDC de la MO, induisant une diminution du réservoir de ces cellules dans la MO uniquement. (C) Lors d'une activation « intermédiaire » des LT (clone H57-597 de l'Ac α CD3), les pDC sont plus profondément touchées dans la rate et les GG. La totalité du réservoir de pDC de la MO va alors permettre de reconstituer la population périphérique de pDC dans la rate. Cette reconstitution n'est pas forcément suffisante, notamment dans les ganglions. (D) Lors d'une activation intense des LT (clones 145-2C11 et 17A2 de l'Ac α CD3), l'apoptose des pDC dans la rate et les GG est sévère et épuise totalement le réservoir médullaire de pDC ne permettant plus la compensation périphérique.

2. Rôle des cytokines inflammatoires dans la régulation de la survie des pDC

Dans le contexte d'un traitement par l'Ac α CD3 un grand nombre de cytokines sécrétées va participer au développement de l'épisode inflammatoire, et certaines vont potentiellement pouvoir initier l'apoptose cellulaire. En premier lieu, nous avons donc logiquement cherché la raison de la perte des pDC dans cette production massive de cytokines inflammatoires. Nous avons ciblé certaines cytokines en

particulier, soit en raison de leur rôle central dans le développement de l'inflammation, soit à cause de leur capacité à induire directement l'apoptose. Nos résultats ont permis d'identifier de nombreuses cytokines sécrétées comme l'IFN- γ , le TNF, l'IL-2, l'IL-6, l'IL-17A, l'IL-4 ou encore l'IL-10, suite à l'injection de l'Ac α CD3. L'objectif a alors été d'essayer de mettre en place un modèle *in vitro* de déplétion des pDC dépendant de l'Ac α CD3, afin de facilement inhiber toutes ces cytokines à l'aide d'Ac bloquant pour identifier le, ou les facteurs incriminés dans ce mécanisme. Pour cela nous avons tenté de cultiver des splénocytes supplémentés avec des pDC triées afin d'augmenter le taux de ces cellules dans la culture. En effet, les pDC sont des cellules sensibles à la manipulation *ex vivo* qui meurent rapidement en culture. Malheureusement, dans ces conditions, aucune perte de pDC n'a jamais pu être observée (figure 22). Pourtant, l'activation des LT était effective avec une augmentation de l'antigène CD25 à leur surface (résultats non figurés). Nous avons alors émis l'hypothèse que le nombre de LT n'était pas suffisant pour que l'orage cytokinique soit assez conséquent afin d'induire l'apoptose des pDC. Nous avons donc tenté de cultiver des LT triés avec des pDC triées afin de simplifier notre système de culture et augmenter le ratio LT/pDC. Mais que ce soit avec l'Ac α CD3 soluble, ou coaté, permettant un cross-linking de l'Ac (plastique-cellule) favorisant l'activation des LT (résultats non figurés), aucune diminution des pDC n'a pu être observée. Notre dernière tentative a été d'ajouter à nos cultures du plasma de souris précédemment injectées avec l'Ac α CD3 mitogénique et contenant les cytokines inflammatoires précédemment décrites. Ce protocole n'a pas permis plus que les autres de mettre en évidence un effondrement du taux de pDC, le plasma s'avérant par lui-même néfaste pour la survie des pDC. Nous pensons que la raison de nos difficultés à mettre en place ce modèle *in vitro* est venue de la faible survie des pDC en culture, ce qui empêche de voir l'effet de notre Ac α CD3 sur leur survie. Même en culture complémentée en IL-3, nous n'avons pas pu adresser le rôle des cytokines inflammatoires sur la survie des pDC. Nous avons donc décidé d'investiguer le rôle de l'orage cytokinique *in vivo*, ces modèles étant plus contraignants mais aussi plus pertinents en terme de physiologie.

La première cytokine à laquelle nous nous sommes intéressés était l'IFN- γ , notamment parce qu'il permet de potentialiser les réponses immunitaires innées en activant les macrophages, entres autres, mais aussi d'activer directement les CTL, ce qui pourrait directement expliquer l'entrée en apoptose des pDC (Walsh and Mills, 2013). Le traitement de souris IFN- $\gamma^{-/-}$ par l'Ac α CD3 induisant une perte des pDC dans les organes lymphoïdes, nous avons rapidement éliminé l'implication de l'IFN- γ dans notre mécanisme (figure 18D). La seconde cytokine qui nous a intéressé était le TNF. Ce facteur pro-inflammatoire était particulièrement intéressant étant donné sa capacité à engager les TNFR, et plus particulièrement le TNFR1 associé au domaine de mort TRADD capable de déclencher l'apoptose cellulaire. Les premières expériences ont montré que l'inhibition du TNF à l'aide d'Ac bloquant permettait de limiter en partie la diminution des pDC dans les organes lymphoïdes (figure 18A). L'effet bénéfique du blocage du TNF sur la survie des pDC reste limité, mais ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'*in vivo* cette cytokine est sécrétée en quantité très importante, et que la quantité d'Ac bloquant anti-TNF utilisée n'était pas en mesure

d'inhiber la totalité du TNF produit. Toutefois, le TNF va se lier au TNFR1 et/ou au TNFR2. Nous avons tout d'abord pu voir que l'injection de l'Ac α CD3 chez des souris TNFR1^{-/-} ne permettait pas de supprimer l'élimination des pDC (figure 18D), infirmant par la même occasion l'hypothèse selon laquelle le TNFR1 par son domaine de mort induirait l'apoptose des pDC. Le TNF semblant en partie capable de contrôler la survie des pDC, comme l'atteste la diminution de la perte des pDC grâce à l'Ac anti-TNF, cet effet passerait par l'engagement du TNFR2. Ce récepteur au TNF est le plus exprimé sur les cellules hématopoïétiques, et il va permettre de fournir un signal d'activation cellulaire et de prolifération grâce à l'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B et AP-1 (pour *activating protein 1*) par l'intermédiaire des protéines TRAF2, IKK et p38MAPK (Bradley, 2008). Il a été montré que l'engagement du TNFR2 sur les LT va favoriser leur survie et les maintenir un état d'activation en réponse à l'Ac α CD3 (Chatzidakis and Mamalaki, 2010), favorisant ainsi l'apoptose des pDC par un autre mécanisme effecteur. Cependant l'injection de l'Ac α CD3 chez des souris TNFR2^{-/-} ne permet pas de maintenir la survie des pDC dans les organes lymphoïdes (figure 18D). L'effet bénéfique sur la survie des pDC quand le TNF est inhibé par un Ac bloquant en amont de l'injection de l'Ac α CD3 passerait donc par l'action combinée du TNFR1 et du TNFR2. En effet l'activation cellulaire passant par NF- κ B et de AP-1 peut également être induite par le TNFR1 (Brenner *et al.*, 2015), ce qui permettrait d'expliquer que la survie des pDC n'est pas améliorée si les souris utilisées sont déficientes pour un seul TNFR. Cette hypothèse est illustrée dans la figure 32. Néanmoins l'ensemble de nos résultats montre que si le TNF peut favoriser la perte des pDC, probablement en potentialisant l'activation des LT, son rôle dans ce mécanisme reste marginal. Tout d'abord le blocage du TNF n'améliore que très légèrement la survie des pDC dans le contexte du traitement par l'Ac α CD3 (figure 18A). Ensuite, quand des souris sont traitées avec du TNF recombinant, le nombre de pDC dans les organes lymphoïdes reste inchangé (résultats non figurés). Ceci montre que cette cytokine par elle-même n'est pas en mesure d'induire une activation des LT suffisante pour impacter la survie des pDC. Enfin, quand l'orage cytokinique est bloqué dans sa globalité grâce à l'injection de la ciclosporine A avant le traitement par l'Ac α CD3, le TNF se retrouve en faible quantité sans que cela n'améliore la survie des pDC (figure 18E et 18F).

Les cytokines pro-inflammatoires majeures comme l'IFN- γ et le TNF n'étant pas directement impliquées dans le contrôle de la survie des pDC, nous nous sommes servis de la ciclosporine A pour réduire la sécrétion d'un grand nombre de cytokines inflammatoires en inhibant l'expression de l'IL-2. Ainsi nous avons pu constater qu'aucune des cytokines inflammatoires (IL-2, IL-4, IL-6, TNF, IFN- γ , IL-17A) n'était directement responsable de l'apoptose des pDC (figure 18E). Cependant comme nous l'avons discuté précédemment, l'activation des LT est nécessaire pour provoquer la perte des pDC. Or la ciclosporine A est censée inhiber l'activation des LT par le blocage de la synthèse de l'IL-2, ce qui en théorie devrait empêcher la perte des pDC. Seulement, chez des souris traitées avec de la ciclosporine A, l'injection de l'Ac α CD3 va quand même augmenter l'expression du marqueur d'activation précoce CD69

à la surface des LT $CD4^+$ et $CD8^+$ (résultats non figurés). Il semble donc que le clone 145-2C11 de l'Ac $\alpha CD3$ produise un effet mitogénique assez puissant pour activer les LT même en présence de ciclosporine.

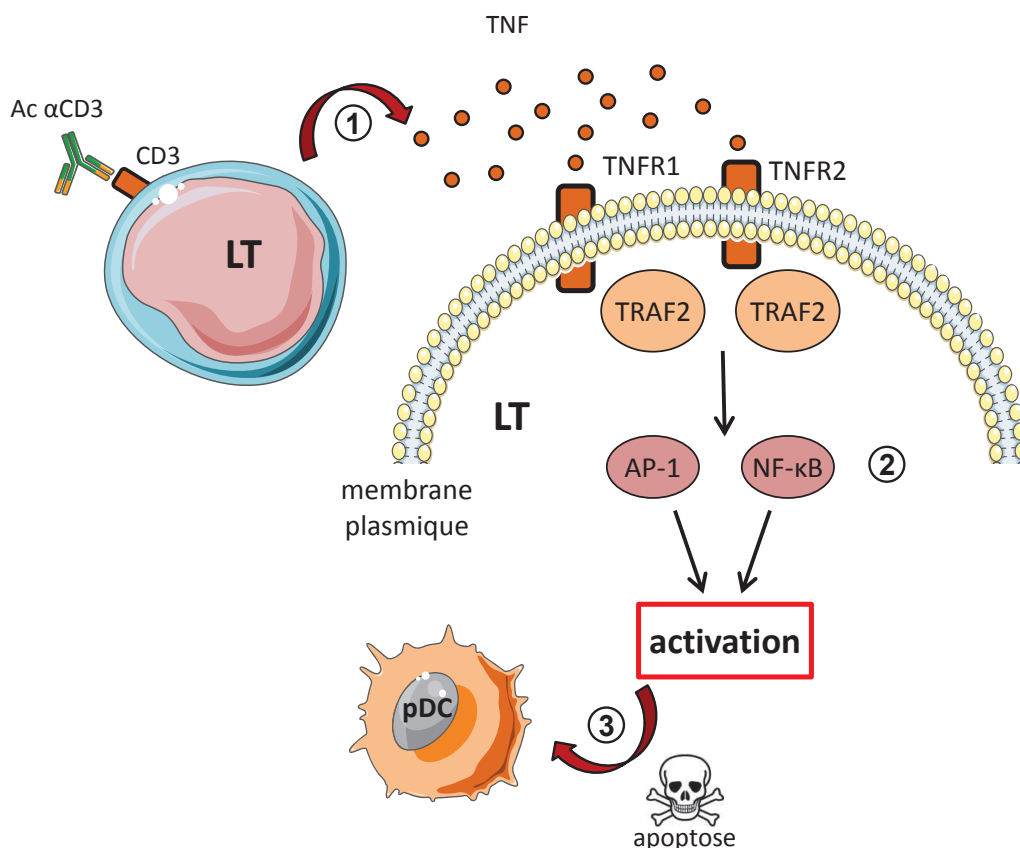


Figure 32 : Le TNF participerait au maintien de l'activation des LT favorisant ainsi indirectement l'apoptose des pDC. 1) L'effet mitogénique de l'Ac $\alpha CD3$ induit la sécrétion de TNF qui va pouvoir se lier aux TNFR1 et TNFR2 à la surface des LT. 2) La transduction du signal par TRAF2 va activer les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B débouchant sur une activation cellulaire. 3) Cette activation cellulaire va alors favoriser indirectement l'apoptose des pDC.

En parallèle des cytokines inflammatoires majoritairement sécrétées par les LT, nous avons aussi vérifié que l'IFN- α sécrété en majorité par les pDC ne pouvait pas induire leur apoptose. Il a été montré que dans un contexte d'infection virale l'IFN- α provoquait la mort des pDC par apoptose, afin de limiter leur capacité à activer le système immunitaire (Swiecki *et al.*, 2011). Chez des souris traitées par l'Ac $\alpha CD3$, il est possible d'imaginer que la forte inflammation conduite à la sécrétion d'IFN- α qui serait néfaste pour la survie des pDC. Cependant l'injection de l'Ac $\alpha CD3$ chez des souris IFNAR $^{-/-}$ a permis de montrer que cette cytokine n'était pas impliquée dans le mécanisme de régulation des pDC que nous tentons de résoudre (figure S2). Au final dans ce contexte inflammatoire non viral le nombre de pDC est régulé, mais pas par un facteur soluble. Nous avons donc recherché quel autre mécanisme effecteur pouvait permettre d'activer l'apoptose dans les pDC. Pour cela nous nous sommes appuyés sur différentes études qui ont montré que la régulation de la survie des cDC était nécessaire pour éviter l'apparition de syndromes inflammatoires incontrôlés (Chen *et al.*, 2006; Stranges *et al.*, 2007).

3. L'activation des LT induit l'apoptose des pDC par la voie de la perforine

Dans le cadre d'une inflammation aigüe induite par l'Ac α CD3, nous avons montré que la présence des LT était nécessaire pour contrôler le nombre de pDC, notamment en utilisant des souris Rag- γ ^{-/-} chez qui la perte des pDC n'est pas observée (figure 16). De plus, comme discuté précédemment, l'activation des LT est primordiale pour que ce mécanisme puisse intervenir. Puisque nous avons éliminé la participation directe de l'orage cytokinique pour expliquer l'entrée en apoptose des pDC, ce phénomène passe donc par d'autres effecteurs. En reprenant les études portant sur le contrôle des fonctions activatrices des cDC, il apparaît que les mécanismes de cytotoxicité directe, portés par les CTL et passant par la voie perforine/granzyme, permettent d'induire l'apoptose de ces cellules pour en limiter leur action (Chen *et al.*, 2012b; Terrell and Jordan, 2013). Nous avons donc évalué l'implication de ces mécanismes dans la déplétion des pDC observée dans notre modèle d'inflammation non viral. Tout d'abord, il est apparu que quelques heures après l'injection de l'Ac α CD3, au moment où les pDC entrent en apoptose (figure 15E et 15F), l'expression du marqueur de dégranulation CD107a, ainsi que de granzyme B, sont augmentés sur les LT CD8⁺ (figure 19B et 19C). Étant donné que ces cellules sont capables de s'activer en CTL, nous avons comparé si ces cellules plus que les LT CD4⁺ activés pouvaient induire une perte des pDC. L'injection de l'Ac α CD3 chez des souris Rag- γ ^{-/-} reconstituées avec des LT CD4⁺ ou CD8⁺ a montré que ces derniers étaient bien plus efficaces pour diminuer le nombre des pDC, dans la rate en particulier (figure 19A). Ce résultat couplé au fait que les LT CD8⁺ produisent une plus grande quantité de granzyme B après injection de l'Ac α CD3, conforte l'hypothèse que les CTL seraient les principaux effecteurs responsables du contrôle de la survie des pDC en condition inflammatoire. Cependant, le granzyme B seul n'est pas suffisant pour induire l'apoptose cellulaire. Il a besoin de la perforine, également produite par les cellules cytotoxiques, pour entrer dans la cellule cible et activer les voies de l'apoptose. Des souris perf^{-/-} ont donc été traitées avec l'Ac α CD3 avec pour résultat l'absence de déplétion des pDC, établissant ainsi que le mécanisme effecteur permettant la régulation du nombre de pDC passe bien par de la cytotoxicité directe (figures 19E et 19F). L'ensemble de nos données semble donc montrer que les cellules porteuses de cette activité cytotoxique sont les CTL. Cependant, il est possible que d'autres cellules puissent aussi participer à ce phénomène. En effet, la diminution des pDC observée chez les souris Rag- γ ^{-/-} reconstituées avec des LT CD8⁺ après injection de l'Ac α CD3, est plus faible en comparaison de souris WT, dans la MO plus particulièrement. Chez ces souris Rag- γ ^{-/-} immunodéficientes, les NK font partie des cellules absentes au même titre que les LT. Les NK possèdent cette fonction cytotoxique, et la présence de certaines cytokines va permettre leur recrutement au site inflammatoire comme le TNF (Smyth *et al.*, 1998), ou encore permettre leur activation comme l'IL-12 (Bancroft, 1993; Orange *et al.*, 1995). Ceci est appuyé par le fait que nous avons observé une augmentation de l'expression de granzyme B dans les NK après injection de l'Ac α CD3 (résultats non figurés). Par ailleurs, l'IL-12 est une cytokine produite par les monocytes/macrophages et les cDC, et est impliquée dans l'activation des CTL (Iwasaki and Medzhitov, 2015). Il est alors possible que dans le contexte inflammatoire induit par l'Ac α CD3, l'action couplée de

l'IL-12 et de l'Ac sur l'antigène CD3 provoque l'activation des fonctions effectrices des CTL mais aussi des NK, diminuant alors le nombre de pDC (figure 33). Il aurait été intéressant de doser la quantité d'IL-12 produite dans le plasma de souris suite à l'injection de l'Ac α CD3 pour appuyer cette hypothèse. Si les CTL et les NK sont les principales cellules portant des fonctions cytotoxiques, il a été montré que d'autres types cellulaires pouvaient fournir le même type de réponse. Ainsi il a été décrit que dans un contexte tumoral, les LT FoxP3⁺ pouvaient provoquer la mort des cDC par la voie de la perforine (Boissonnas *et al.*, 2010). L'expérience utilisant les souris Rag- γ c^{-/-} a par ailleurs montré une légère diminution des pDC dans la MO des souris traitées par l'Ac α CD3 et reconstituées avec des LT CD4⁺. L'ensemble de ces résultats montre qu'un mécanisme de contrôle de la survie des pDC passant par la voie de la perforine existe en cas de forte inflammation. De plus comme nos résultats l'ont montré, les LT CD8⁺ sont des cellules importantes dans l'induction de l'apoptose des pDC passant par la voie de la perforine, mais les LT CD4⁺ dans une moindre mesure, et surtout les NK pourraient participer à ce phénomène de déplétion des pDC (figure 33). Cependant, nous n'avons pas directement montré que c'est la fonction perforine/granzyme, portée spécifiquement par les LT CD8⁺, qui était responsable de l'effet cytotoxique envers les pDC. Pour démontrer cela il aurait été intéressant de comparer la perte des pDC chez des souris Rag- γ c^{-/-}, reconstituées avec des LT CD8⁺ WT ou des LT CD8⁺ perf^{-/-}, et traitées par l'Ac α CD3.

Les études décrivant la régulation de la survie des cDC dans le contrôle de l'activation des réponses immunitaires impliquent la voie de la perforine, mais certaines montrent que la voie Fas/FasL est aussi importante dans ces mécanismes (Chen *et al.*, 2012b; Stranges *et al.*, 2007). Nous avons donc essayé dans notre modèle d'inflammation aigüe, de détecter une augmentation de l'expression des récepteurs de mort à la surface des pDC, comme Fas, mais aussi de récepteurs à TRAIL comme DR5 (figure 28). Les résultats ont montré que 2 h après l'injection de l'Ac α CD3, l'expression de ces récepteurs n'est pas augmentée sur les pDC. Cependant, il aurait été intéressant de regarder l'expression de Fas et des TRAILR plus tardivement, aux temps où l'apoptose des pDC commence à être observée dans les organes lymphoïdes (à partir de 10 h en particulier). L'expérience idéale aurait été de tester le traitement par l'Ac α CD3 chez des souris transgéniques *lpr*, déficientes en Fas. Ainsi, nous aurions pu facilement incriminer cette voie dans le mécanisme contrôlant la survie des pDC.

Au final notre modèle initial utilisant l'Ac α CD3 avait pour but de mettre en place un état inflammatoire aigu, permettant d'évaluer le devenir des pDC dans des conditions où elles étaient susceptibles d'être activées. En mettant en évidence que les LT CD8⁺ et la voie de la perforine sont en mesure de contrôler la survie des pDC, nous avons pour la première fois décrit ce type de mécanisme dans un contexte inflammatoire. Cependant, le modèle « Ac α CD3 » produit une réponse inflammatoire artificielle qui ne correspond pas exactement aux réponses observées physiologiquement. Nous nous sommes donc interrogés sur la pertinence de ce phénomène de régulation de survie des pDC, lors de syndromes inflammatoires présents dans certaines pathologies.

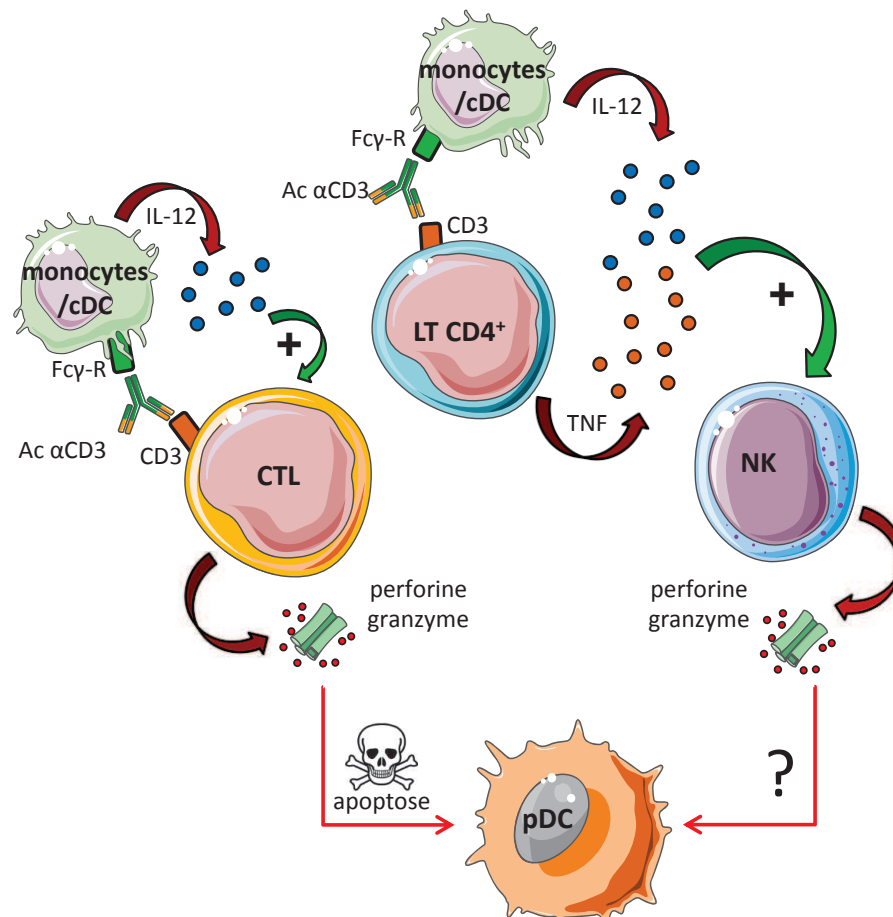


Figure 33 : Le contrôle de la survie des pDC en condition inflammatoire est notamment assuré par la perforine. L'injection de l'Ac α CD3 va provoquer l'activation des LT CD8⁺ en CTL qui vont fournir une réponse cytotoxique dépendante de la perforine, et provoquer l'apoptose des pDC. De la même manière, les NK sont activés dans le contexte du traitement par l'Ac α CD3 et pourraient participer à la déplétion des pDC par les mêmes mécanismes. Le signal activateur des CTL doit passer par la liaison de l'antigène CD3 à leur surface, mais pourrait aussi être fourni par l'IL-12 produite par les monocytes/macrophages et les cDC activées par la liaison Fc/Fc γ -R. L'activation des NK pourrait, comme pour les CTL, passer par la sécrétion d'IL-12, mais aussi par le TNF produit par les LT CD4⁺ activés par l'Ac α CD3 (Goumy *et al.*, 1996).

4. Relevance du mécanisme de régulation de la survie des pDC dans le cadre de pathologies inflammatoires

Les pDC étant des cellules capables d'activer les réponses immunitaires, ce phénomène pourrait prévenir la survenue de syndromes inflammatoires incontrôlés. En effet, les pDC sont capables d'intervenir dans le développement de maladies auto-immunes comme le SLE, le psoriasis, la SEP ou encore le diabète de type I. De plus, la régulation de leur fonction semble primordiale au maintien de réponses immunitaires contrôlées. Cependant, le mécanisme que nous avons établi se produit dans un modèle expérimental « Ac α CD3 », induisant une inflammation très aigüe, où le nombre de facteurs solubles sécrétés est plus important que ce qui est retrouvé dans différentes pathologies inflammatoires. Nous avons donc vérifié dans d'autres syndromes inflammatoires, que le phénomène de régulation de la survie des pDC pouvait

intervenir. Sachant que la déplétion des pDC dans le modèle de l'Ac α CD3 est dépendante de l'activation des LT et des LT CD8⁺ en particulier, nous avons utilisé des modèles où l'inflammation passait par l'activation de ces cellules. Pour cela, différents modèles de GvHD aigües ont été mis en place. Le premier modèle consiste en une injection de splénocytes de souris parents dans F1, où le donneur et le receveur présentent une incompatibilité au niveau des molécules du CMH-I et du CMH-II. La survenue de la GVHD dans ce cas est entraînée par les LT CD4⁺ et CD8⁺ (Hakim *et al.*, 1991). Les pDC, dans ce modèle, sont supprimées en totalité (figure 17A), mais il est possible que cette perte soit due à une allo-réactivité des splénocytes du donneur vis-à-vis des cellules du receveur. En effet, dans ce modèle les pDC étudiées sont d'origine du receveur. Pour outrepasser ce biais d'alloréactivité directe sur les pDC, nous avons utilisé un modèle de GvHD avec irradiation, dans lequel l'injection de cellules médullaires de souris donneuses (C57Bl/6) va conduire à la reconstitution d'une hématopoïèse d'origine du donneur chez les souris receveuses (Balb/c). Dans ce cas chez les souris receveuses, les pDC seront de même origine que les LT CD4⁺ et CD8⁺ responsables de la GvHD, syndrome inflammatoire post-greffe. Nos résultats ont montré que les pDC sont diminuées dans les organes lymphoïdes des souris déclarant une GvHD, et ce, de façon proportionnelle à la dose de LT injectés (figure 17D). Il semble donc que la survie des pDC est réduite et associée à l'activation des LT, ce qui conforte l'idée que le mécanisme de déplétion des pDC faisant intervenir la perforine et les LT CD8⁺ puisse intervenir dans un autre contexte que celui de l'Ac α CD3. Il aurait été intéressant dans ce dernier modèle de GvHD d'évaluer les LT CD8⁺ et la perforine. Pour cela, des LT de souris WT ou *perf*^{-/-} auraient pu être utilisés pour induire la GvHD. Cependant, il a été reporté que la perforine jouait un rôle dans le développement de la GvHD, ce qui pourrait nous empêcher d'induire le syndrome inflammatoire avec des LT *perf*^{-/-} (Baker *et al.*, 1996; Braun *et al.*, 1996). Néanmoins, plusieurs études ont rapporté que l'utilisation de LT *perf*^{-/-} pour induire la GvHD était possible, si elle était basée sur une incompatibilité complète pour le CMH-I et le CMH-II entre le donneur et le receveur (Graubert *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2001; Levy *et al.*, 1995). Cette expérience apporterait donc un éclairage sur la relevance du mécanisme de déplétion des pDC par les LT CD8⁺ et la perforine, en condition inflammatoire dans un modèle plus physiologique.

Si les pDC ne sont pas des cellules particulièrement décrites comme participant fortement au développement de la GvHD, ces cellules sont primordiales dans le développement de plusieurs pathologies auto-immunes. Ainsi leur rôle dans l'initiation de maladie comme le SLE, le psoriasis, la SEP ou encore le diabète de type I est aujourd'hui bien établi. C'est dans ce contexte, où les pDC sont directement impliquées dans le développement d'épisodes inflammatoires, que le contrôle de leur survie par les LT CD8⁺ et la perforine pourrait intervenir en limitant leur fonction activatrice des réponses immunitaires. Ainsi, dans tous ces syndromes auto-immuns, c'est au moment de l'initiation de la maladie que les pDC sont les plus importantes (Albanesi *et al.*, 2010; Isaksson *et al.*, 2009; Li and McDevitt, 2011; Rowland *et al.*, 2014). Elles sont en effet capables d'infiltrer les tissus cibles, et leur élimination au moment de

l'induction de ces pathologies va systématiquement améliorer la sévérité de la maladie dans des modèles murins (tableau 1).

Tableau 1 : Implication et devenir des pDC et de l'activité des LT CD8⁺ dans différentes pathologies auto-immunes.

Pathologies auto-immunes	pDC/IFN- α dans les tissus cibles de la maladie (initiation)	Effet de la déplétion des pDC à l'initiation de la maladie	pDC/IFN- α lors de la phase chronique de la maladie	CTL lors de la phase chronique de la maladie
SLE	↑ des pDC dans les reins et la peau (Farkas <i>et al.</i> , 2001) (Fiore <i>et al.</i> , 2008)	Sévérité réduite de la maladie (Rowland <i>et al.</i> , 2014)	↑ [IFN- α] sérique produit par les pDC (Baechler <i>et al.</i> , 2003)	↓ des fonctions CTL (Puliaeva <i>et al.</i> , 2009)
psoriasis	↑ des pDC dans la peau (Albanesi <i>et al.</i> , 2009) (Gilliet <i>et al.</i> , 2004)	Sévérité réduite de la maladie (Glitzner <i>et al.</i> , 2014)	↓ des pDC dans la peau (Albanesi <i>et al.</i> , 2010)	↑ LT CD8 ⁺ dans la peau (Onuma, 1994)
SEP	↑ des pDC dans le LCS (Lande <i>et al.</i> , 2008)	Sévérité réduite de la maladie (Isaksson <i>et al.</i> , 2009)	↑ des pDC avec des propriétés régulatrices dans le LCS (Longhini <i>et al.</i> , 2011)	↓ des LT CD8 ⁺ dans le SNC (Weiss <i>et al.</i> , 2007)
diabète de type I	↑ de l'IFN- α dans le pancréas ↑ des pDC sanguines (Huang <i>et al.</i> , 1995) (Xia <i>et al.</i> , 2014b)	Prévention du développement de la maladie (Li and McDevitt, 2011)	↓ des pDC sanguines en comparaison de la phase d'initiation de la maladie (Xia <i>et al.</i> , 2014b)	↑ persistante des LT CD8 ⁺ activés dans le sang (Peakman <i>et al.</i> , 1996)

Plus tard dans les phases chroniques de certaines de ces maladies, il arrive que les pDC soient réduites, comme dans le psoriasis par exemple, où l'infiltrat de pDC au niveau de la peau n'est plus observé. Ceci s'accompagne d'une forte augmentation des LT CD8⁺, toujours dans la peau (tableau 1). De façon similaire dans le diabète de type I, si les pDC sont augmentées au niveau sanguin dans la phase pré-diabétique, leur taux diminue lorsque la maladie s'installe à long terme. De plus, ceci est lié avec la persistance de LT CD8⁺ activés dans le sang (tableau 1). À l'inverse, dans d'autres syndromes auto-immuns comme dans le SLE ou la SEP, les pDC se retrouvent augmentées dans le sang et dans les tissus cibles lors d'épisodes de rechutes de ces maladies. Ceci est associé avec une réduction de l'activité des CTL dans le cas du SLE, et avec une diminution des LT CD8⁺ retrouvés au niveau du SNC dans la SEP (tableau 1). Il est alors très intéressant de noter que le taux de pDC et des LT CD8⁺ lors des phases chroniques de ces pathologies auto-immunes est inversement corrélé. Il est alors possible de formuler l'hypothèse suivante : lors de l'initiation de ces syndromes auto-immuns, une dérégulation immunitaire va mener à l'activation aberrante des pDC, ce qui va conduire au développement de la maladie. Afin de limiter au maximum les conséquences néfastes de ce phénomène, le système immunitaire tenterait alors de réguler les pDC, par exemple en utilisant les fonctions CTL passant par la perforine. Par ailleurs, dans le cadre de la SEP, lors de la phase chronique de la maladie, les pDC présentent un profil plutôt régulateur

(tableau 1). De plus dans des modèles d'EAE, l'élimination des pDC lors de la phase chronique de la maladie va augmenter sa sévérité (Bailey-Bucktrout *et al.*, 2008). Dans le cadre de notre hypothèse, il est possible d'imaginer qu'après l'élimination des pDC pour contrôler la phase initiale de la maladie, celles-ci reviennent avec un profil plus régulateur pour limiter au maximum le développement de la pathologie. Nos résultats vont d'ailleurs dans ce sens, car au moment de leur reconstitution chez des souris traitées par l'Ac α CD3, les pDC semblent moins sensibles à une activation de leur voie TLR9 par du CpG-A (figure 29). À l'inverse, il est également possible que lors de la phase chronique de l'EAE, quand les pDC possèdent un profil plutôt tolérogène, l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ aient un effet néfaste sur la maladie en provoquant leur déplétion. À la lumière de toutes ces données, l'action des voies de cytotoxicité sur les pDC dans ces pathologies auto-immunes pourrait être investiguée, afin de voir si ce mécanisme de contrôle de la survie de ces cellules intervient dans le contrôle des maladies auto-immunes. Ceci pourrait être directement adressé dans des modèles d'EAE, de psoriasis ou encore de SEP, induits chez des souris *perf*^{-/-}, afin de voir si le développement des maladies est plus important que chez des souris WT. Ceci a d'ailleurs été montré dans des modèles d'EAE (Malipiero *et al.*, 1997) et de souris *lpr* développant spontanément un syndrome lupique (Peng *et al.*, 1998), où l'absence de perforine aggrave fortement la sévérité de ces maladies. Pour poursuivre notre raisonnement et montrer que dans ce cadre, c'est l'absence de régulation de la survie des pDC qui est, *in fine*, responsable de l'aggravation de ces maladies, il serait intéressant de reproduire ces expériences en éliminant les pDC pour voir si cela améliore la pathologie. Nous pouvons également imaginer utiliser directement les fonctions de cytotoxicité passant par la perforine pour améliorer le développement de ces syndromes auto-immuns, comme cela a déjà pu être suggéré dans le SLE (Puliaeva *et al.*, 2009).

Les pDC sont donc des cellules primordiales dans le déroulement des réponses immunitaires. Si elles sont spécialisées dans la lutte antivirale, leur action ne s'arrête pas là, et ces cellules sont capables d'activer un grand nombre d'effecteurs de l'immunité adaptative comme les LT. Cette propriété des pDC peut les conduire à participer au développement de syndromes inflammatoires chroniques si elles sont activées de façon disproportionnelle ou incontrôlée, avec des complexes contenant de l'ADN du soi par exemple. C'est pourquoi il doit exister des mécanismes de contrôle permettant de réguler l'action de ces cellules. Les travaux réalisés pendant cette thèse ont tout d'abord permis de mettre en évidence que la survie des pDC est réduite dans un contexte inflammatoire induit par l'Ac α CD3. Nous avons ensuite pu montrer que dans ce cadre, ce sont les LT CD8⁺ et les fonctions cytotoxiques de la perforine qui vont induire l'élimination des pDC. Par ailleurs cette déplétion des pDC a pu être observée dans d'autres modèles inflammatoires impliquant les LT, comme la GvHD. Enfin, l'ensemble des données de la littérature sur l'implication des pDC dans le développement de maladies auto-immunes, montre que cette régulation de la survie des pDC par la voie perforine, pourrait être un mécanisme dont il serait possible de tirer parti pour contrôler ces pathologies.

Références

A

- Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature reviews. Immunology* *10*, 131-144.
- Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* *17*, 593-623.
- Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R.M., and Wagner, H. (2002). Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *European journal of immunology* *32*, 1958-1968.
- Akira, S. (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Current opinion in immunology* *15*, 5-11.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* *124*, 783-801.
- Alba, A., Puertas, M.C., Carrillo, J., Planas, R., Ampudia, R., Pastor, X., Bosch, F., Pujol-Borrell, R., Verdaguer, J., and Vives-Pi, M. (2004). IFN beta accelerates autoimmune type 1 diabetes in nonobese diabetic mice and breaks the tolerance to beta cells in nondiabetes-prone mice. *J Immunol* *173*, 6667-6675.
- Albanesi, C., and Pastore, S. (2010). Pathobiology of chronic inflammatory skin diseases: interplay between keratinocytes and immune cells as a target for anti-inflammatory drugs. *Current drug metabolism* *11*, 210-227.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Bosisio, D., Sozzani, S., and Girolomoni, G. (2010). Immune functions and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in psoriasis. *Autoimmunity* *43*, 215-219.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Pallotta, S., Daniele, R., Bosisio, D., Madonna, S., Fortugno, P., Gonzalvo-Feo, S., Franssen, J.D., Parmentier, M., *et al.* (2009). Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. *The Journal of experimental medicine* *206*, 249-258.
- Alegre, M., Vandenabeele, P., Flamand, V., Moser, M., Leo, O., Abramowicz, D., Urbain, J., Fiers, W., and Goldman, M. (1990). Hypothermia and hypoglycemia induced by anti-CD3 monoclonal antibody in mice: role of tumor necrosis factor. *European journal of immunology* *20*, 707-710.
- Alegre, M.L., Tso, J.Y., Sattar, H.A., Smith, J., Desalle, F., Cole, M., and Bluestone, J.A. (1995). An anti-murine CD3 monoclonal antibody with a low affinity for Fc gamma receptors suppresses transplantation responses while minimizing acute toxicity and immunogenicity. *J Immunol* *155*, 1544-1555.
- Alegre, M.L., Vandenabeele, P., Depierreux, M., Florquin, S., Deschodt-Lanckman, M., Flamand, V., Moser, M., Leo, O., Urbain, J., Fiers, W., and *et al.* (1991). Cytokine release syndrome induced by the 145-2C11 anti-CD3 monoclonal antibody in mice: prevention by high doses of methylprednisolone. *J Immunol* *146*, 1184-1191.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* *413*, 732-738.
- Allen, J.E., and Maizels, R.M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature reviews. Immunology* *11*, 375-388.
- Altfeld, M., Fadda, L., Frleta, D., and Bhardwaj, N. (2011). DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nature reviews. Immunology* *11*, 176-186.
- Ambrosi, A., Espinosa, A., and Wahren-Herlenius, M. (2012). IL-17: a new actor in IFN-driven systemic autoimmune diseases. *European journal of immunology* *42*, 2274-2284.
- Angelot, F., Seilles, E., Biichle, S., Berda, Y., Gaugler, B., Plumas, J., Chaperot, L., Dignat-George, F., Tiberghien, P., Saas, P., and Garnache-Ottou, F. (2009). Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica* *94*, 1502-1512.
- Arase, H., Arase, N., and Saito, T. (1995). Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* *181*, 1235-1238.
- Ariel, A., Fredman, G., Sun, Y.P., Kantarci, A., Van Dyke, T.E., Luster, A.D., and Serhan, C.N. (2006). Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nature immunology* *7*, 1209-1216.
- Arumugam, T.V., Okun, E., Tang, S.C., Thundiyil, J., Taylor, S.M., and Woodruff, T.M. (2009). Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. *Shock* *32*, 4-16.

Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., Vicari, A., O'Garra, A., Biron, C., Briere, F., and Trinchieri, G. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nature immunology* 2, 1144-1150.

Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Chemin, K., Boonstra, A., O'Garra, A., Vicari, A., and Trinchieri, G. (2005). Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *The Journal of experimental medicine* 201, 1157-1167.

Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, J.J., Briere, F., and Trinchieri, G. (2003). Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol* 171, 6466-6477.

Aung, L.L., Fitzgerald-Bocarsly, P., Dhib-Jalbut, S., and Balashov, K. (2010). Plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis: chemokine and chemokine receptor modulation by interferon-beta. *Journal of neuroimmunology* 226, 158-164.

B

Bachem, A., Guttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., *et al.* (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 207, 1273-1281.

Baechler, E.C., Batliwalla, F.M., Karypis, G., Gaffney, P.M., Ortmann, W.A., Espe, K.J., Shark, K.B., Grande, W.J., Hughes, K.M., Kapur, V., *et al.* (2003). Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2610-2615.

Bailey-Bucktrout, S.L., Caulkins, S.C., Goings, G., Fischer, J.A., Dzionek, A., and Miller, S.D. (2008). Cutting edge: central nervous system plasmacytoid dendritic cells regulate the severity of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180, 6457-6461.

Baker, M.B., Altman, N.H., Podack, E.R., and Levy, R.B. (1996). The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *The Journal of experimental medicine* 183, 2645-2656.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Bancroft, G.J. (1993). The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Current opinion in immunology* 5, 503-510.

Bao, M., and Liu, Y.J. (2013). Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein & cell* 4, 40-52.

Barr, M.L., Sanchez, J.A., Seche, L.A., Schulman, L.L., Smith, C.R., and Rose, E.A. (1990). Anti-CD3 monoclonal antibody induction therapy. Immunological equivalency with triple-drug therapy in heart transplantation. *Circulation* 82, IV291-294.

Barton, G.M., and Kagan, J.C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nature reviews. Immunology* 9, 535-542.

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-729.

Bave, U., Magnusson, M., Eloranta, M.L., Perers, A., Alm, G.V., and Ronnblom, L. (2003). Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG. *J Immunol* 171, 3296-3302.

Belghith, M., Bluestone, J.A., Barriot, S., Megret, J., Bach, J.F., and Chatenoud, L. (2003). TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nature medicine* 9, 1202-1208.

Bengtsson, A.A., Sturfelt, G., Truedsson, L., Blomberg, J., Alm, G., Vallin, H., and Ronnblom, L. (2000). Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus* 9, 664-671.

- Benitez-Ribas, D., Adema, G.J., Winkels, G., Klasen, I.S., Punt, C.J., Figdor, C.G., and de Vries, I.J. (2006). Plasmacytoid dendritic cells of melanoma patients present exogenous proteins to CD4⁺ T cells after Fc gamma RII-mediated uptake. *The Journal of experimental medicine* 203, 1629-1635.
- Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M., and Noelle, R.J. (2007). All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *The Journal of experimental medicine* 204, 1765-1774.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* 81, 1-5.
- Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 294, 1540-1543.
- Blasius, A.L., Barchet, W., Cella, M., and Colonna, M. (2007). Development and function of murine B220⁺CD11c⁺NK1.1⁺ cells identify them as a subset of NK cells. *The Journal of experimental medicine* 204, 2561-2568.
- Blasius, A.L., Cella, M., Maldonado, J., Takai, T., and Colonna, M. (2006a). Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood* 107, 2474-2476.
- Blasius, A.L., Giurisato, E., Cella, M., Schreiber, R.D., Shaw, A.S., and Colonna, M. (2006b). Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J Immunol* 177, 3260-3265.
- Boissonnas, A., Scholer-Dahirel, A., Simon-Blancal, V., Pace, L., Valet, F., Kissenpfennig, A., Sparwasser, T., Malissen, B., Fétler, L., and Amigorena, S. (2010). Foxp3⁺ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* 32, 266-278.
- Bonnefoy, F., Couturier, M., Clauzon, A., Remy-Martin, J.P., Gaugler, B., Tiberghien, P., Chen, W., Saas, P., and Perruche, S. (2011a). TGF- β -exposed plasmacytoid dendritic cells participate in Th17 commitment. *J Immunol* 186, 6157-6164.
- Bonnefoy, F., Perruche, S., Couturier, M., Sedrati, A., Sun, Y., Tiberghien, P., Gaugler, B., and Saas, P. (2011b). Plasmacytoid dendritic cells play a major role in apoptotic leukocyte-induced immune modulation. *J Immunol* 186, 5696-5705.
- Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y.J., and O'Garra, A. (2003). Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *The Journal of experimental medicine* 197, 101-109.
- Bosi, E., Minelli, R., Bazzigaluppi, E., and Salvi, M. (2001). Fulminant autoimmune Type 1 diabetes during interferon- α therapy: a case of Th1-mediated disease? *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 18, 329-332.
- Boule, M.W., Broughton, C., Mackay, F., Akira, S., Marshak-Rothstein, A., and Rifkin, I.R. (2004). Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *The Journal of experimental medicine* 199, 1631-1640.
- Bradley, J.R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of pathology* 214, 149-160.
- Braun, M.Y., Lowin, B., French, L., Acha-Orbea, H., and Tschopp, J. (1996). Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *The Journal of experimental medicine* 183, 657-661.
- Brenner, D., Blaser, H., and Mak, T.W. (2015). Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nature reviews. Immunology* 15, 362-374.
- Bristow, M.R., Gilbert, E.M., O'Connell, J.B., Renlund, D.G., Watson, F.S., Hammond, E., Lee, R.G., and Menlove, R. (1988). OKT3 monoclonal antibody in heart transplantation. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 11, 135-140.
- Brown, G.D., and Netea, M.G. (2012). Exciting developments in the immunology of fungal infections. *Cell host & microbe* 11, 422-424.

C

- Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nature immunology* 1, 305-310.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature medicine* 5, 919-923.
- Cervantes-Barragan, L., Lewis, K.L., Firmer, S., Thiel, V., Hugues, S., Reith, W., Ludewig, B., and Reizis, B. (2012). Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 3012-3017.
- Charpentier, B., Hiesse, C., Lantz, O., Ferran, C., Stephens, S., O'Shaugnessy, D., Bodmer, M., Benoit, G., Bach, J.F., and Chatenoud, L. (1992). Evidence that antihuman tumor necrosis factor monoclonal antibody prevents OKT3-induced acute syndrome. *Transplantation* 54, 997-1002.
- Chatenoud, L., Ferran, C., and Bach, J.F. (1991). The anti-CD3-induced syndrome: a consequence of massive in vivo cell activation. *Current topics in microbiology and immunology* 174, 121-134.
- Chatenoud, L., Ferran, C., Legendre, C., Thouard, I., Merite, S., Reuter, A., Gevaert, Y., Kreis, H., Franchimont, P., and Bach, J.F. (1990). In vivo cell activation following OKT3 administration. Systemic cytokine release and modulation by corticosteroids. *Transplantation* 49, 697-702.
- Chatenoud, L., Ferran, C., Reuter, A., Legendre, C., Gevaert, Y., Kreis, H., Franchimont, P., and Bach, J.F. (1988). [T lymphocyte activation induced in vivo by the first injection of OKT3 monoclonal antibodies]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 307, 833-836.
- Chatenoud, L., Ferran, C., Reuter, A., Legendre, C., Gevaert, Y., Kreis, H., Franchimont, P., and Bach, J.F. (1989). Systemic reaction to the anti-T-cell monoclonal antibody OKT3 in relation to serum levels of tumor necrosis factor and interferon-gamma [corrected]. *The New England journal of medicine* 320, 1420-1421.
- Chatenoud, L., Primo, J., and Bach, J.F. (1997). CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *J Immunol* 158, 2947-2954.
- Chatenoud, L., Thervet, E., Primo, J., and Bach, J.F. (1994). Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 123-127.
- Chatzidakis, I., and Mamalaki, C. (2010). T cells as sources and targets of TNF: implications for immunity and autoimmunity. *Current directions in autoimmunity* 11, 105-118.
- Chen, F., Liu, Z., Wu, W., Roza, C., Bowdridge, S., Millman, A., Van Rooijen, N., Urban, J.F., Jr., Wynn, T.A., and Gause, W.C. (2012a). An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nature medicine* 18, 260-266.
- Chen, L.W., Chang, W.J., Chen, P.H., Liu, W.C., and Hsu, C.M. (2008a). TLR ligand decreases mesenteric ischemia and reperfusion injury-induced gut damage through TNF-alpha signaling. *Shock* 30, 563-570.
- Chen, M., Felix, K., and Wang, J. (2012b). Critical role for perforin and Fas-dependent killing of dendritic cells in the control of inflammation. *Blood* 119, 127-136.
- Chen, M., Huang, L., and Wang, J. (2007). Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity. *Blood* 109, 4360-4367.
- Chen, M., Wang, Y.H., Wang, Y., Huang, L., Sandoval, H., Liu, Y.J., and Wang, J. (2006). Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science* 311, 1160-1164.
- Chen, W., Frank, M.E., Jin, W., and Wahl, S.M. (2001). TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 14, 715-725.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198, 1875-1886.
- Chen, W., Liang, X., Peterson, A.J., Munn, D.H., and Blazar, B.R. (2008b). The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* 181, 5396-5404.

- Clemens, M.J., and Elia, A. (1997). The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 17, 503-524.
- Clementi, R., zur Stadt, U., Savoldi, G., Varoitto, S., Conter, V., De Fusco, C., Notarangelo, L.D., Schneider, M., Klersy, C., Janka, G., *et al.* (2001). Six novel mutations in the PRF1 gene in children with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Journal of medical genetics* 38, 643-646.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450, 566-569.
- Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature immunology* 5, 1219-1226.
- Conrad, C., Gregorio, J., Wang, Y.H., Ito, T., Meller, S., Hanabuchi, S., Anderson, S., Atkinson, N., Ramirez, P.T., Liu, Y.J., *et al.* (2012). Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer research* 72, 5240-5249.
- Coomes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* 204, 1757-1764.
- Cosimi, A.B., Burton, R.C., Colvin, R.B., Goldstein, G., Delmonico, F.L., LaQuaglia, M.P., Tolkoff-Rubin, N., Rubin, R.H., Herrin, J.T., and Russell, P.S. (1981). Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. *Transplantation* 32, 535-539.
- Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.A., Ventre, E., Vu Manh, T.P., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., *et al.* (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 207, 1283-1292.

D

- Dalgaard, J., Beckstrom, K.J., Jahnsen, F.L., and Brinchmann, J.E. (2005). Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets. *Journal of leukocyte biology* 77, 689-698.
- Dall'era, M.C., Cardarelli, P.M., Preston, B.T., Witte, A., and Davis, J.C., Jr. (2005). Type I interferon correlates with serological and clinical manifestations of SLE. *Annals of the rheumatic diseases* 64, 1692-1697.
- Dalod, M., Hamilton, T., Salomon, R., Salazar-Mather, T.P., Henry, S.C., Hamilton, J.D., and Biron, C.A. (2003). Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *The Journal of experimental medicine* 197, 885-898.
- de Brito, C., Tomkowiak, M., Ghittoni, R., Caux, C., Leverrier, Y., and Marvel, J. (2011). CpG promotes cross-presentation of dead cell-associated antigens by pre-CD8alpha+ dendritic cells [corrected]. *J Immunol* 186, 1503-1511.
- de Weerd, N.A., Samarajiwa, S.A., and Hertzog, P.J. (2007). Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *The Journal of biological chemistry* 282, 20053-20057.
- den Haan, J.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 192, 1685-1696.
- Desch, A.N., Gibbings, S.L., Clambey, E.T., Janssen, W.J., Slansky, J.E., Kedl, R.M., Henson, P.M., and Jakubzick, C. (2014). Dendritic cell subsets require cis-activation for cytotoxic CD8 T-cell induction. *Nature communications* 5, 4674.
- Desch, A.N., Randolph, G.J., Murphy, K., Gautier, E.L., Kedl, R.M., Lahoud, M.H., Caminschi, I., Shortman, K., Henson, P.M., and Jakubzick, C.V. (2011). CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *The Journal of experimental medicine* 208, 1789-1797.
- Devendra, D., and Eisenbarth, G.S. (2004). Interferon alpha--a potential link in the pathogenesis of viral-induced type 1 diabetes and autoimmunity. *Clin Immunol* 111, 225-233.

- Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sorensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., Xue, Y., Mellman, I., Banchereau, J., and Connolly, J.E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nature immunology* 9, 551-557.
- Diana, J., Simoni, Y., Furio, L., Beaudoin, L., Agerberth, B., Barrat, F., and Lehuen, A. (2013). Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nature medicine* 19, 65-73.
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531.
- Doreau, A., Belot, A., Bastid, J., Riche, B., Trescol-Biemont, M.C., Ranchin, B., Fabien, N., Cochat, P., Pouteil-Noble, C., Trolliet, P., *et al.* (2009). Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nature immunology* 10, 778-785.
- Dorner, B.G., Dorner, M.B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Guttler, S., Hutloff, A., Mages, H.W., Ranke, K., Schaefer, M., *et al.* (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8⁺ T cells. *Immunity* 31, 823-833.
- Duan, X.Z., Wang, M., Li, H.W., Zhuang, H., Xu, D., and Wang, F.S. (2004). Decreased frequency and function of circulating plasmacytoid dendritic cells (pDC) in hepatitis B virus infected humans. *Journal of clinical immunology* 24, 637-646.
- Dybdahl, B., Wahba, A., Lien, E., Flo, T.H., Waage, A., Qureshi, N., Sellevold, O.F., Espevik, T., and Sundan, A. (2002). Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* 105, 685-690.
- Dzionek, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., *et al.* (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *The Journal of experimental medicine* 194, 1823-1834.

E

- Edelson, B.T., Bradstreet, T.R., Hildner, K., Carrero, J.A., Frederick, K.E., Kc, W., Belizaire, R., Aoshi, T., Schreiber, R.D., Miller, M.J., *et al.* (2011). CD8alpha(+) dendritic cells are an obligate cellular entry point for productive infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunity* 35, 236-248.
- Evans, D.T., Serra-Moreno, R., Singh, R.K., and Guatelli, J.C. (2010). BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses. *Trends in microbiology* 18, 388-396.

F

- Fabris, P., Floreani, A., Tositti, G., Vergani, D., De Lalla, F., and Betterle, C. (2003). Type 1 diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C before and after interferon therapy. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 18, 549-558.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson, P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *The Journal of clinical investigation* 101, 890-898.
- Fallarino, F., Asselin-Paturel, C., Vacca, C., Bianchi, R., Gizzi, S., Fioretti, M.C., Trinchieri, G., Grohmann, U., and Puccetti, P. (2004). Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J Immunol* 173, 3748-3754.
- Farkas, L., Beiske, K., Lund-Johansen, F., Brandtzaeg, P., and Jahnsen, F.L. (2001). Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *The American journal of pathology* 159, 237-243.
- Ferran, C., Dautry, F., Merite, S., Sheehan, K., Schreiber, R., Grau, G., Bach, J.F., and Chatenoud, L. (1994). Anti-tumor necrosis factor modulates anti-CD3-triggered T cell cytokine gene expression in vivo. *The Journal of clinical investigation* 93, 2189-2196.

- Ferran, C., Dy, M., Sheehan, K., Merite, S., Schreiber, R., Landais, P., Grau, G., Bluestone, J., Bach, J.F., and Chatenoud, L. (1991a). Inter-mouse strain differences in the in vivo anti-CD3 induced cytokine release. *Clinical and experimental immunology* 86, 537-543.
- Ferran, C., Dy, M., Sheehan, K., Schreiber, R., Grau, G., Bluestone, J., Bach, J.F., and Chatenoud, L. (1991b). Cascade modulation by anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody of interferon-gamma, interleukin 3 and interleukin 6 release after triggering of the CD3/T cell receptor activation pathway. *European journal of immunology* 21, 2349-2353.
- Ferran, C., Sheehan, K., Dy, M., Schreiber, R., Merite, S., Landais, P., Noel, L.H., Grau, G., Bluestone, J., Bach, J.F., and et al. (1990). Cytokine-related syndrome following injection of anti-CD3 monoclonal antibody: further evidence for transient in vivo T cell activation. *European journal of immunology* 20, 509-515.
- Ferran, C., Sheehan, K., Schreiber, R., Bach, J.F., and Chatenoud, L. (1991c). Anti-TNF abrogates the cytokine-related anti-CD3 induced syndrome. *Transplantation proceedings* 23, 849-850.
- Ferrero, I., Held, W., Wilson, A., Tacchini-Cottier, F., Radtke, F., and MacDonald, H.R. (2002). Mouse CD11c(+) B220(+) Gr1(+) plasmacytoid dendritic cells develop independently of the T-cell lineage. *Blood* 100, 2852-2857.
- Finke, J.S., Shodell, M., Shah, K., Siegal, F.P., and Steinman, R.M. (2004). Dendritic cell numbers in the blood of HIV-1 infected patients before and after changes in antiretroviral therapy. *Journal of clinical immunology* 24, 647-652.
- Fiore, N., Castellano, G., Blasi, A., Capobianco, C., Loverre, A., Montinaro, V., Netti, S., Torres, D., Manno, C., Grandaliano, G., et al. (2008). Immature myeloid and plasmacytoid dendritic cells infiltrate renal tubulointerstitium in patients with lupus nephritis. *Molecular immunology* 45, 259-265.
- Fonteneau, J.F., Gilliet, M., Larsson, M., Dasilva, I., Munz, C., Liu, Y.J., and Bhardwaj, N. (2003). Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 101, 3520-3526.
- Freud, A.G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H.C., Ferketich, A.K., Nuovo, G.J., Hughes, T.L., Marburger, T.B., Sung, J., Baiocchi, R.A., et al. (2005). A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* 22, 295-304.
- Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stahle-Backdahl, M., Liden, S., Wigzell, H., and Gudmundsson, G.H. (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *The Journal of biological chemistry* 272, 15258-15263.

G

- Gao, Y., Herndon, J.M., Zhang, H., Griffith, T.S., and Ferguson, T.A. (1998). Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *The Journal of experimental medicine* 188, 887-896.
- Garcia-Romo, G.S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R.L., et al. (2011). Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine* 3, 73ra20.
- Gardella, S., Andrei, C., Ferrera, D., Lotti, L.V., Torrisi, M.R., Bianchi, M.E., and Rubartelli, A. (2002). The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO reports* 3, 995-1001.
- Garofalo, R., Mei, F., Espejo, R., Ye, G., Haeberle, H., Baron, S., Ogra, P.L., and Reyes, V.E. (1996). Respiratory syncytial virus infection of human respiratory epithelial cells up-regulates class I MHC expression through the induction of IFN-beta and IL-1 alpha. *J Immunol* 157, 2506-2513.
- Gautier, G., Humbert, M., Deauvieu, F., Scuiller, M., Hiscott, J., Bates, E.E., Trinchieri, G., Caux, C., and Garrone, P. (2005). A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 201, 1435-1446.
- Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., and Trinchieri, G. (2005). The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* 174, 727-734.

- Gilliet, M., Conrad, C., Geiges, M., Cozzio, A., Thurlimann, W., Burg, G., Nestle, F.O., and Dummer, R. (2004). Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Archives of dermatology* 140, 1490-1495.
- Glas, R., Franksson, L., Une, C., Eloranta, M.L., Ohlen, C., Orn, A., and Karre, K. (2000). Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses. *The Journal of experimental medicine* 191, 129-138.
- Glitzner, E., Korosec, A., Brunner, P.M., Drobits, B., Amberg, N., Schonhaler, H.B., Kopp, T., Wagner, E.F., Stingl, G., Holcman, M., and Sibilia, M. (2014). Specific roles for dendritic cell subsets during initiation and progression of psoriasis. *EMBO molecular medicine* 6, 1312-1327.
- Gordon, R.D., Tzakis, A.G., Iwatsuki, S., Todo, S., Esquivel, C.O., Marsh, J.W., Stieber, A., Makowka, L., and Starzl, T.E. (1988). Experience with Orthoclone OKT3 monoclonal antibody in liver transplantation. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 11, 141-144.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews. Immunology* 5, 953-964.
- Goumy, L., Ferran, C., Merite, S., Bach, J.F., and Chatenoud, L. (1996). In vivo anti-CD3-driven cell activation. Cellular source of induced tumor necrosis factor, interleukin-1 beta, and interleukin-6. *Transplantation* 61, 83-87.
- Goutagny, N., Vieux, C., Decullier, E., Ligeoix, B., Epstein, A., Trepo, C., Couzigou, P., Inchauspe, G., and Bain, C. (2004). Quantification and functional analysis of plasmacytoid dendritic cells in patients with chronic hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases* 189, 1646-1655.
- Graubert, T.A., DiPersio, J.F., Russell, J.H., and Ley, T.J. (1997). Perforin/granzyme-dependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. *The Journal of clinical investigation* 100, 904-911.
- Grouard, G., Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *The Journal of experimental medicine* 185, 1101-1111.
- Guarda, G., Hons, M., Soriano, S.F., Huang, A.Y., Polley, R., Martin-Fontecha, A., Stein, J.V., Germain, R.N., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). L-selectin-negative CCR7- effector and memory CD8+ T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells. *Nature immunology* 8, 743-752.
- Guillerme, J.B., Boisgerault, N., Roulois, D., Menager, J., Combredet, C., Tangy, F., Fonteneau, J.F., and Gregoire, M. (2013). Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19, 1147-1158.
- Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2014). The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nature reviews. Immunology* 14, 94-108.

H

- Hakim, F.T., Sharrow, S.O., Payne, S., and Shearer, G.M. (1991). Repopulation of host lymphohematopoietic systems by donor cells during graft-versus-host reaction in unirradiated adult F1 mice injected with parental lymphocytes. *J Immunol* 146, 2108-2115.
- Haller, O., Frese, M., and Kochs, G. (1998). Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech* 17, 220-230.
- Hanabuchi, S., Ito, T., Park, W.R., Watanabe, N., Shaw, J.L., Roman, E., Arima, K., Wang, Y.H., Voo, K.S., Cao, W., and Liu, Y.J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol* 184, 2999-3007.
- Haniffa, M., Collin, M., and Ginhoux, F. (2013). Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. *Advances in immunology* 120, 1-49.
- Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.N., Malinarich, F., Malleret, B., *et al.* (2012). Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 37, 60-73.

- Hart, D.N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90, 3245-3287.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2009). Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nature immunology* 10, 1237-1244.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature immunology* 3, 196-200.
- Hermans, I.F., Ritchie, D.S., Yang, J., Roberts, J.M., and Ronchese, F. (2000). CD8⁺ T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity. *J Immunol* 164, 3095-3101.
- Hervas-Stubbs, S., Perez-Gracia, J.L., Rouzaut, A., Sanmamed, M.F., Le Bon, A., and Melero, I. (2011). Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 2619-2627.
- Hirsch, R., Bluestone, J.A., DeNenno, L., and Gress, R.E. (1990). Anti-CD3 F(ab')₂ fragments are immunosuppressive in vivo without evoking either the strong humoral response or morbidity associated with whole mAb. *Transplantation* 49, 1117-1123.
- Hirsch, R., Eckhaus, M., Auchincloss, H., Jr., Sachs, D.H., and Bluestone, J.A. (1988). Effects of in vivo administration of anti-T3 monoclonal antibody on T cell function in mice. *J Immunol* 140, 3766-3772.
- Hirsch, R., Gress, R.E., Pluznik, D.H., Eckhaus, M., and Bluestone, J.A. (1989). Effects of in vivo administration of anti-CD3 monoclonal antibody on T cell function in mice. *J Immunol* 142, 737-743.
- Hochrein, H., O'Keeffe, M., and Wagner, H. (2002). Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. *Human immunology* 63, 1103-1110.
- Hoeffel, G., Ripoche, A.C., Matheoud, D., Nascimbeni, M., Escriou, N., Lebon, P., Heshmati, F., Guillet, J.G., Gannage, M., Caillat-Zucman, S., *et al.* (2007). Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 27, 481-492.
- Hofmann, M.A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., *et al.* (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97, 889-901.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., and Taniguchi, T. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772-777.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162, 3749-3752.
- Huang, X., Yuang, J., Goddard, A., Foulis, A., James, R.F., Lernmark, A., Pujol-Borrell, R., Rabinovitch, A., Somoza, N., and Stewart, T.A. (1995). Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes* 44, 658-664.

I

- Igyarto, B.Z., Haley, K., Ortner, D., Bobr, A., Gerami-Nejad, M., Edelson, B.T., Zurawski, S.M., Malissen, B., Zurawski, G., Berman, J., and Kaplan, D.H. (2011). Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses. *Immunity* 35, 260-272.
- Ingulli, E., Mondino, A., Khoruts, A., and Jenkins, M.K. (1997). In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *The Journal of experimental medicine* 185, 2133-2141.
- Ip, W.K., and Lau, Y.L. (2004). Distinct maturation of, but not migration between, human monocyte-derived dendritic cells upon ingestion of apoptotic cells of early or late phases. *J Immunol* 173, 189-196.

Irla, M., Kupfer, N., Suter, T., Lissilaa, R., Benkhoucha, M., Skupsky, J., Lalive, P.H., Fontana, A., Reith, W., and Hugues, S. (2010). MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 207, 1891-1905.

Isaksson, M., Ardesjo, B., Ronnblom, L., Kampe, O., Lassmann, H., Eloranta, M.L., and Lobell, A. (2009). Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE. *European journal of immunology* 39, 2925-2935.

Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Hori, T., Ota, M., Nakamura, K., Takebayashi, M., Miyaji, M., Yoshimura, T., Inaba, K., and Fukuhara, S. (2004). Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol* 172, 4253-4259.

Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., *et al.* (1999). A CD1a⁺/CD11c⁺ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol* 163, 1409-1419.

Ito, T., Yang, M., Wang, Y.H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O.A., Qin, X.F., Liu, Y.J., and Gillet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *The Journal of experimental medicine* 204, 105-115.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology* 16, 343-353.

Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R.M., and Inaba, K. (2002). The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *The Journal of experimental medicine* 195, 1289-1302.

J

Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology 54 Pt 1, 1-13.

Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20, 197-216.

Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19, 225-234.

Jiang, Z., Podack, E., and Levy, R.B. (2001). Major histocompatibility complex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation using perforin and/or Fas ligand double-defective CD4⁺ donor T cells: involvement of cytotoxic function by donor lymphocytes prior to graft-versus-host disease pathogenesis. *Blood* 98, 390-397.

Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., *et al.* (2010). Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *The Journal of experimental medicine* 207, 1247-1260.

Jordan, M.B., Hildeman, D., Kappler, J., and Marrack, P. (2004). An animal model of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): CD8⁺ T cells and interferon gamma are essential for the disorder. *Blood* 104, 735-743.

K

Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J.Y., and Liu, Y.J. (2000). Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *The Journal of experimental medicine* 192, 219-226.

Kaiserman, D., Bird, C.H., Sun, J., Matthews, A., Ung, K., Whisstock, J.C., Thompson, P.E., Trapani, J.A., and Bird, P.I. (2006). The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. *The Journal of cell biology* 175, 619-630.

Kamogawa-Schifter, Y., Ohkawa, J., Namiki, S., Arai, N., Arai, K., and Liu, Y. (2005). Ly49Q defines 2 pDC subsets in mice. *Blood* 105, 2787-2792.

Kanto, T., Inoue, M., Miyatake, H., Sato, A., Sakakibara, M., Yakushijin, T., Oki, C., Itose, I., Hiramatsu, N., Takehara, T., *et al.* (2004). Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *The Journal of infectious diseases* 190, 1919-1926.

- Karrich, J.J., Jachimowski, L.C., Uittenbogaart, C.H., and Blom, B. (2014). The plasmacytoid dendritic cell as the Swiss army knife of the immune system: molecular regulation of its multifaceted functions. *J Immunol* 193, 5772-5778.
- Kavousanaki, M., Makrigiannakis, A., Boumpas, D., and Verginis, P. (2010). Novel role of plasmacytoid dendritic cells in humans: induction of interleukin-10-producing Treg cells by plasmacytoid dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis responding to therapy. *Arthritis and rheumatism* 62, 53-63.
- Kawai, T., and Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell death and differentiation* 13, 816-825.
- Kawai, T., Sato, S., Ishii, K.J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S., *et al.* (2004). Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nature immunology* 5, 1061-1068.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.
- Kiener, P.A., Rankin, B.M., Burkhardt, A.L., Schieven, G.L., Gilliland, L.K., Rowley, R.B., Bolen, J.B., and Ledbetter, J.A. (1993). Cross-linking of Fc gamma receptor I (Fc gamma RI) and receptor II (Fc gamma RII) on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry* 268, 24442-24448.
- Kim, J.M., Park, S.H., Kim, H.Y., and Kwok, S.K. (2015). A Plasmacytoid Dendritic Cells-Type I Interferon Axis Is Critically Implicated in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *International journal of molecular sciences* 16, 14158-14170.
- Kim, S., Elkon, K.B., and Ma, X. (2004). Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity* 21, 643-653.
- Kim, T., Pazhoor, S., Bao, M., Zhang, Z., Hanabuchi, S., Facchinetti, V., Bover, L., Plumas, J., Chaperot, L., Qin, J., and Liu, Y.J. (2010). Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15181-15186.
- Klechevsky, E., Morita, R., Liu, M., Cao, Y., Coquery, S., Thompson-Snipes, L., Briere, F., Chaussabel, D., Zurawski, G., Palucka, A.K., *et al.* (2008). Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity* 29, 497-510.
- Kleinclauss, F., Perruche, S., Masson, E., de Carvalho Bittencourt, M., Biichle, S., Remy-Martin, J.P., Ferrand, C., Martin, M., Bittard, H., Chalopin, J.M., *et al.* (2006). Intravenous apoptotic spleen cell infusion induces a TGF-beta-dependent regulatory T-cell expansion. *Cell death and differentiation* 13, 41-52.
- Kokkola, R., Li, J., Sundberg, E., Aveberger, A.C., Palmblad, K., Yang, H., Tracey, K.J., Andersson, U., and Harris, H.E. (2003). Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. *Arthritis and rheumatism* 48, 2052-2058.
- Kolaczowska, E., and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 13, 159-175.
- Kool, M., Geurtsvankessel, C., Muskens, F., Madeira, F.B., van Nimwegen, M., Kuipers, H., Thielemans, K., Hoogsteden, H.C., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2011). Facilitated antigen uptake and timed exposure to TLR ligands dictate the antigen-presenting potential of plasmacytoid DCs. *Journal of leukocyte biology* 90, 1177-1190.
- Krispin, A., Bledi, Y., Atallah, M., Trahtemberg, U., Verbovetski, I., Nahari, E., Zelig, O., Linial, M., and Mevorach, D. (2006). Apoptotic cell thrombospondin-1 and heparin-binding domain lead to dendritic-cell phagocytic and tolerizing states. *Blood* 108, 3580-3589.
- Krug, A., French, A.R., Barchet, W., Fischer, J.A., Dzionek, A., Pingel, J.T., Orihuela, M.M., Akira, S., Yokoyama, W.M., and Colonna, M. (2004a). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21, 107-119.
- Krug, A., Luker, G.D., Barchet, W., Leib, D.A., Akira, S., and Colonna, M. (2004b). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 103, 1433-1437.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A.M., and Hartmann, G. (2001). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *European journal of immunology* 31, 3026-3037.

Krug, A., Veeraswamy, R., Pekosz, A., Kanagawa, O., Unanue, E.R., Colonna, M., and Cella, M. (2003). Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells. *The Journal of experimental medicine* 197, 899-906.

Kuhn, J.R., and Poenie, M. (2002). Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity* 16, 111-121.

Kumamoto, Y., Linehan, M., Weinstein, J.S., Laidlaw, B.J., Craft, J.E., and Iwasaki, A. (2013). CD301b(+) dermal dendritic cells drive T helper 2 cell-mediated immunity. *Immunity* 39, 733-743.

L

Lande, R., Gafa, V., Serafini, B., Giacomini, E., Visconti, A., Remoli, M.E., Severa, M., Parmentier, M., Ristori, G., Salvetti, M., *et al.* (2008). Plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis: intracerebral recruitment and impaired maturation in response to interferon-beta. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67, 388-401.

Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciari, V., *et al.* (2011). Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine* 3, 73ra19.

Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D.F. (2003). Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nature immunology* 4, 1009-1015.

Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., and Tough, D.F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 14, 461-470.

Lee, C.K., Rao, D.T., Gertner, R., Gimeno, R., Frey, A.B., and Levy, D.E. (2000). Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function. *J Immunol* 165, 3571-3577.

Lee, L.N., Burke, S., Montoya, M., and Borrow, P. (2009). Multiple mechanisms contribute to impairment of type I interferon production during chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. *J Immunol* 182, 7178-7189.

Leo, O., Foo, M., Sachs, D.H., Samelson, L.E., and Bluestone, J.A. (1987). Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 1374-1378.

Lepelletier, Y., Zollinger, R., Ghirelli, C., Raynaud, F., Hadj-Slimane, R., Cappuccio, A., Hermine, O., Liu, Y.J., and Soumelis, V. (2010). Toll-like receptor control of glucocorticoid-induced apoptosis in human plasmacytoid predendritic cells (pDCs). *Blood* 116, 3389-3397.

Levy, R.B., Baker, M., and Podack, E.R. (1995). Perforin-deficient T cells can induce acute graft-versus-host disease after transplantation of MHC-matched or MHC disparate allogeneic bone marrow. *Annals of the New York Academy of Sciences* 770, 366-367.

Ley, K., Smith, E., and Stark, M.A. (2006). IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunologic research* 34, 229-242.

Li, Q., and McDevitt, H.O. (2011). The role of interferon alpha in initiation of type I diabetes in the NOD mouse. *Clin Immunol* 140, 3-7.

Li, Q., Xu, B., Michie, S.A., Rubins, K.H., Schreiber, R.D., and McDevitt, H.O. (2008). Interferon-alpha initiates type I diabetes in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 12439-12444.

Lieschke, G.J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K.J., Basu, S., Zhan, Y.F., and Dunn, A.R. (1994). Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 84, 1737-1746.

Lindstedt, M., Schiott, A., Bengtsson, A., Larsson, K., Korsgren, M., Greiff, L., and Borrebaeck, C.A. (2005). Genomic and functional delineation of dendritic cells and memory T cells derived from grass pollen-allergic patients and healthy individuals. *International immunology* 17, 401-409.

Liu, C., Lou, Y., Lizée, G., Qin, H., Liu, S., Rabinovich, B., Kim, G.J., Wang, Y.H., Ye, Y., Sikora, A.G., *et al.* (2008). Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *The Journal of clinical investigation* 118, 1165-1175.

- Longhini, A.L., von Glehn, F., Brandao, C.O., de Paula, R.F., Pradella, F., Moraes, A.S., Farias, A.S., Oliveira, E.C., Quispe-Cabanillas, J.G., Abreu, C.H., *et al.* (2011). Plasmacytoid dendritic cells are increased in cerebrospinal fluid of untreated patients during multiple sclerosis relapse. *Journal of neuroinflammation* 8, 2.
- Lopez, J.A., Susanto, O., Jenkins, M.R., Lukoyanova, N., Sutton, V.R., Law, R.H., Johnston, A., Bird, C.H., Bird, P.I., Whisstock, J.C., *et al.* (2013). Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood* 121, 2659-2668.
- Loschko, J., Schlitzer, A., Dudziak, D., Drexler, I., Sandholzer, N., Bourquin, C., Reindl, W., and Krug, A.B. (2011). Antigen delivery to plasmacytoid dendritic cells via BST2 induces protective T cell-mediated immunity. *J Immunol* 186, 6718-6725.
- Lovik, G., Vaage, J.T., Naper, C., Benestad, H.B., and Rolstad, B. (1995). Recruitment of alloreactive natural killer cells to the rat peritoneum by a transfected cell line secreting rat recombinant interleukin-2. *Journal of immunological methods* 179, 59-69.
- Ludewig, B., Odermatt, B., Landmann, S., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1998). Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. *The Journal of experimental medicine* 188, 1493-1501.
- Lui, G., Manches, O., Angel, J., Molens, J.P., Chaperot, L., and Plumas, J. (2009). Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PloS one* 4, e7111.
- Lund, J., Sato, A., Akira, S., Medzhitov, R., and Iwasaki, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 198, 513-520.

M

- Malipiero, U., Frei, K., Spanaus, K.S., Agresti, C., Lassmann, H., Hahne, M., Tschopp, J., Eugster, H.P., and Fontana, A. (1997). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis is chronic/relapsing in perforin knockout mice, but monophasic in Fas- and Fas ligand-deficient lpr and gld mice. *European journal of immunology* 27, 3151-3160.
- Manches, O., Munn, D., Fallahi, A., Lifson, J., Chaperot, L., Plumas, J., and Bhardwaj, N. (2008). HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation* 118, 3431-3439.
- Mandal, A., and Viswanathan, C. (2015). Natural killer cells: In health and disease. *Hematology/oncology and stem cell therapy* 8, 47-55.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441, 231-234.
- Marshak-Rothstein, A. (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nature reviews. Immunology* 6, 823-835.
- Martin-Gayo, E., Sierra-Filardi, E., Corbi, A.L., and Toribio, M.L. (2010). Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* 115, 5366-5375.
- Martin, P., Del Hoyo, G.M., Anjuere, F., Arias, C.F., Vargas, H.H., Fernandez, L.A., Parrillas, V., and Ardavin, C. (2002). Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* 100, 383-390.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* 6, 13.
- Martinez, J., Huang, X., and Yang, Y. (2008). Direct action of type I IFN on NK cells is required for their activation in response to vaccinia viral infection in vivo. *J Immunol* 180, 1592-1597.
- Mashayekhi, M., Sandau, M.M., Dunay, I.R., Frickel, E.M., Khan, A., Goldszmid, R.S., Sher, A., Ploegh, H.L., Murphy, T.L., Sibley, L.D., and Murphy, K.M. (2011). CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity* 35, 249-259.
- Masson, D., and Tschopp, J. (1987). A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell* 49, 679-685.

- Matloubian, M., Suresh, M., Glass, A., Galvan, M., Chow, K., Whitmire, J.K., Walsh, C.M., Clark, W.R., and Ahmed, R. (1999). A role for perforin in downregulating T-cell responses during chronic viral infection. *Journal of virology* *73*, 2527-2536.
- McDonald, P.P., Fadok, V.A., Bratton, D., and Henson, P.M. (1999). Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol* *163*, 6164-6172.
- Means, T.K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M.R., Golenbock, D.T., and Luster, A.D. (2005). Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *The Journal of clinical investigation* *115*, 407-417.
- Medvedev, A.E., Sabroe, I., Hasday, J.D., and Vogel, S.N. (2006). Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. *Journal of endotoxin research* *12*, 133-150.
- Meera, S., Madhuri, T., Manisha, G., and Ramesh, P. (2010). Irreversible loss of pDCs by apoptosis during early HIV infection may be a critical determinant of immune dysfunction. *Viral immunology* *23*, 241-249.
- Mellor, A.L., Baban, B., Chandler, P., Marshall, B., Jhaver, K., Hansen, A., Koni, P.A., Iwashima, M., and Munn, D.H. (2003). Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol* *171*, 1652-1655.
- Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature reviews. Immunology* *4*, 762-774.
- Merad, M., Ginhoux, F., and Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature reviews. Immunology* *8*, 935-947.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology* *31*, 563-604.
- Meurs, E.F., Watanabe, Y., Kadereit, S., Barber, G.N., Katze, M.G., Chong, K., Williams, B.R., and Hovanessian, A.G. (1992). Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth. *Journal of virology* *66*, 5805-5814.
- Mevorach, D., Zuckerman, T., Reiner, I., Shimoni, A., Samuel, S., Nagler, A., Rowe, J.M., and Or, R. (2014). Single infusion of donor mononuclear early apoptotic cells as prophylaxis for graft-versus-host disease in myeloablative HLA-matched allogeneic bone marrow transplantation: a phase I/IIa clinical trial. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* *20*, 58-65.
- Meyer-Wentrup, F., Benitez-Ribas, D., Tacke, P.J., Punt, C.J., Figdor, C.G., de Vries, I.J., and Adema, G.J. (2008). Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN-alpha production. *Blood* *111*, 4245-4253.
- Migita, K., Miyashita, T., Maeda, Y., Kimura, H., Nakamura, M., Yatsushashi, H., Ishibashi, H., and Eguchi, K. (2005). Reduced blood BDCA-2+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology* *142*, 84-91.
- Mills, K.H. (2008). Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *European journal of immunology* *38*, 2636-2649.
- Miyake, Y., Asano, K., Kaise, H., Uemura, M., Nakayama, M., and Tanaka, M. (2007). Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *The Journal of clinical investigation* *117*, 2268-2278.
- Montoya, M., Schiavoni, G., Mattei, F., Gresser, I., Belardelli, F., Borrow, P., and Tough, D.F. (2002). Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* *99*, 3263-3271.
- Morelli, A.E., and Larregina, A.T. (2010). Apoptotic cell-based therapies against transplant rejection: role of recipient's dendritic cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* *15*, 1083-1097.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Papworth, G.D., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo, L.D., Jr., and Thomson, A.W. (2003). Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* *101*, 611-620.

- Moseman, E.A., Liang, X., Dawson, A.J., Panoskaltsis-Mortari, A., Krieg, A.M., Liu, Y.J., Blazar, B.R., and Chen, W. (2004). Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 173, 4433-4442.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology* 8, 958-969.
- Mougel, F., Bonnefoy, F., Kury-Paulin, S., Borot, S., Perruche, S., Kantelip, B., Penfornis, A., Saas, P., and Kleinclauss, F. (2012). Intravenous infusion of donor apoptotic leukocytes before transplantation delays allogeneic islet graft rejection through regulatory T cells. *Diabetes & metabolism* 38, 531-537.
- Muller-Hermelink, H.K., Stein, H., Steinmann, G., and Lennert, K. (1983). Malignant lymphoma of plasmacytoid T-cells. Morphologic and immunologic studies characterizing a special type of T-cell. *The American journal of surgical pathology* 7, 849-862.
- Munn, D.H., Sharma, M.D., Hou, D., Baban, B., Lee, J.R., Antonia, S.J., Messina, J.L., Chandler, P., Koni, P.A., and Mellor, A.L. (2004). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *The Journal of clinical investigation* 114, 280-290.
- Murakami, R., Denda-Nagai, K., Hashimoto, S., Nagai, S., Hattori, M., and Irimura, T. (2013). A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2. *PloS one* 8, e73270.
- Murakami, Y., Kong, Y.Y., Nishimura, Y., Nomoto, K., Umesue, M., Omoto, K., and Maeda, T. (1995). Prevention of anti-T-cell receptor alpha beta monoclonal antibody-induced side-effects by treatment with cyclosporin A without interference of monoclonal antibody-induced immunosuppression in mice. *Immunology* 86, 238-243.
- Muto, N.F., Martinand-Mari, C., Adelson, M.E., and Suhadolnik, R.J. (1999). Inhibition of replication of reactivated human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in latently infected U1 cells transduced with an HIV-1 long terminal repeat-driven PKR cDNA construct. *Journal of virology* 73, 9021-9028.

N

- Nagata, S., and Suda, T. (1995). Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunology today* 16, 39-43.
- Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M.D. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 194, 1171-1178.
- Nauseef, W.M., and Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nature immunology* 15, 602-611.
- Neil, S.J., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425-430.
- Nestle, F.O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y.J., and Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *The Journal of experimental medicine* 202, 135-143.
- Nestle, F.O., Zheng, X.G., Thompson, C.B., Turka, L.A., and Nickoloff, B.J. (1993). Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol* 151, 6535-6545.
- Nguyen, K.B., Salazar-Mather, T.P., Dalod, M.Y., Van Deusen, J.B., Wei, X.Q., Liew, F.Y., Caligiuri, M.A., Durbin, J.E., and Biron, C.A. (2002). Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* 169, 4279-4287.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nature reviews. Immunology* 8, 34-47.
- Norman, D.J., Shield, C.F., 3rd, Barry, J., Bennett, W.M., Henell, K., Kimball, J., Funnell, B., and Hubert, B. (1988). Early use of OKT3 monoclonal antibody in renal transplantation to prevent rejection. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 11, 107-110.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., and Weinshenker, B.G. (2000). Multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 343, 938-952.
- Nussenzweig, M.C., Steinman, R.M., Gutchinov, B., and Cohn, Z.A. (1980). Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 152, 1070-1084.

O

- Ochando, J.C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., *et al.* (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nature immunology* 7, 652-662.
- Ochi, H., Abraham, M., Ishikawa, H., Frenkel, D., Yang, K., Basso, A.S., Wu, H., Chen, M.L., Gandhi, R., Miller, A., *et al.* (2006). Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4⁺ CD25⁻ LAP⁺ T cells. *Nature medicine* 12, 627-635.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S., and Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164, 558-561.
- Onuma, S. (1994). Immunohistochemical studies of infiltrating cells in early and chronic lesions of psoriasis. *The Journal of dermatology* 21, 223-232.
- Orange, J.S., Wang, B., Terhorst, C., and Biron, C.A. (1995). Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *The Journal of experimental medicine* 182, 1045-1056.
- OrthoMulticenterTransplantStudyGroup (1985). A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. Ortho Multicenter Transplant Study Group. *The New England journal of medicine* 313, 337-342.
- Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13766-13771.

P

- Palacios, R. (1985). Mechanisms by which accessory cells contribute in growth of resting T lymphocytes initiated by OKT3 antibody. *European journal of immunology* 15, 645-651.
- Parlato, S., Santini, S.M., Lapenta, C., Di Pucchio, T., Logozzi, M., Spada, M., Giammarioli, A.M., Malorni, W., Fais, S., and Belardelli, F. (2001). Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood* 98, 3022-3029.
- Peakman, M., Leslie, R.D., Alviggi, L., Hawa, M., and Vergani, D. (1996). Persistent activation of CD8⁺ T-cells characterizes prediabetic twins. *Diabetes care* 19, 1177-1184.
- Peng, S.L., Moslehi, J., Robert, M.E., and Craft, J. (1998). Perforin protects against autoimmunity in lupus-prone mice. *J Immunol* 160, 652-660.
- Perruche, S., Kleinclauss, F., Bittencourt Mde, C., Paris, D., Tiberghien, P., and Saas, P. (2004). Intravenous infusion of apoptotic cells simultaneously with allogeneic hematopoietic grafts alters anti-donor humoral immune responses. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4, 1361-1365.
- Perruche, S., and Saas, P. (2009). [CD3-specific antibody-induced T-cell apoptosis and apoptotic cell uptake lead to CD3-specific antibody-induced tolerance]. *Medecine sciences : M/S* 25, 325-327.
- Perruche, S., Saas, P., and Chen, W. (2009a). Apoptotic cell-mediated suppression of streptococcal cell wall-induced arthritis is associated with alteration of macrophage function and local regulatory T-cell increase: a potential cell-based therapy? *Arthritis research & therapy* 11, R104.
- Perruche, S., Zhang, P., Liu, Y., Saas, P., Bluestone, J.A., and Chen, W. (2008). CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nature medicine* 14, 528-535.
- Perruche, S., Zhang, P., Maruyama, T., Bluestone, J.A., Saas, P., and Chen, W. (2009b). Lethal effect of CD3-specific antibody in mice deficient in TGF-beta1 by uncontrolled flu-like syndrome. *J Immunol* 183, 953-961.

Persson, E.K., Uronen-Hansson, H., Semmrich, M., Rivollier, A., Hagerbrand, K., Marsal, J., Gudjonsson, S., Hakansson, U., Reizis, B., Kotarsky, K., and Agace, W.W. (2013). IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity* 38, 958-969.

Poulin, L.F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J.L., Keller, A.M., Joffre, O., Zelenay, S., Nye, E., *et al.* (2010). Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 207, 1261-1271.

Puliaeva, I., Puliaev, R., and Via, C.S. (2009). Therapeutic potential of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in SLE. *Autoimmunity reviews* 8, 219-223.

R

Raff, M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400.

Reid, D.M., Gow, N.A., and Brown, G.D. (2009). Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Current opinion in immunology* 21, 30-37.

Rinnoooy Kan, E.A., Wright, S.D., Welte, K., and Wang, C.Y. (1986). Fc receptors on monocytes cause OKT3-treated lymphocytes to internalize T3 and to secrete IL-2. *Cellular immunology* 98, 181-187.

Robbins, S.H., Walzer, T., Dembele, D., Thibault, C., Defays, A., Bessou, G., Xu, H., Vivier, E., Sellars, M., Pierre, P., *et al.* (2008). Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome biology* 9, R17.

Robinson, M.J., Osorio, F., Rosas, M., Freitas, R.P., Schweighoffer, E., Gross, O., Verbeek, J.S., Ruland, J., Tybulewicz, V., Brown, G.D., *et al.* (2009). Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *The Journal of experimental medicine* 206, 2037-2051.

Robinson, S.P., Patterson, S., English, N., Davies, D., Knight, S.C., and Reid, C.D. (1999). Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *European journal of immunology* 29, 2769-2778.

Roelofs, M.F., Boelens, W.C., Joosten, L.A., Abdollahi-Roodsaz, S., Geurts, J., Wunderink, L.U., Schreurs, B.W., van den Berg, W.B., and Radstake, T.R. (2006). Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 176, 7021-7027.

Roskrow, M.A., Dilloo, D., Suzuki, N., Zhong, W., Rooney, C.M., and Brenner, M.K. (1999). Autoimmune disease induced by dendritic cell immunization against leukemia. *Leukemia research* 23, 549-557.

Rowland, S.L., Riggs, J.M., Gilfillan, S., Bugatti, M., Vermi, W., Kolbeck, R., Unanue, E.R., Sanjuan, M.A., and Colonna, M. (2014). Early, transient depletion of plasmacytoid dendritic cells ameliorates autoimmunity in a lupus model. *The Journal of experimental medicine* 211, 1977-1991.

Ruocco, G., Rossi, S., Motta, C., Macchiarulo, G., Barbieri, F., De Bardi, M., Borsellino, G., Finardi, A., Grasso, M.G., Ruggieri, S., *et al.* (2015). T helper 9 cells induced by plasmacytoid dendritic cells regulate interleukin-17 in multiple sclerosis. *Clin Sci (Lond)* 129, 291-303.

S

Sabroe, I., Prince, L.R., Jones, E.C., Horsburgh, M.J., Foster, S.J., Vogel, S.N., Dower, S.K., and Whyte, M.K. (2003). Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol* 170, 5268-5275.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775-787.

Salazar-Mather, T.P., Orange, J.S., and Biron, C.A. (1998). Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways. *The Journal of experimental medicine* 187, 1-14.

Salio, M., Cella, M., Vermi, W., Facchetti, F., Palmowski, M.J., Smith, C.L., Shepherd, D., Colonna, M., and Cerundolo, V. (2003). Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *European journal of immunology* 33, 1052-1062.

- Salio, M., Palmowski, M.J., Atzberger, A., Hermans, I.F., and Cerundolo, V. (2004). CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *The Journal of experimental medicine* 199, 567-579.
- Samuel, C.E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clinical microbiology reviews* 14, 778-809, table of contents.
- Sandgren, K.J., Smed-Sorensen, A., Forsell, M.N., Soldemo, M., Adams, W.C., Liang, F., Perbeck, L., Koup, R.A., Wyatt, R.T., Karlsson Hedestam, G.B., and Lore, K. (2013). Human plasmacytoid dendritic cells efficiently capture HIV-1 envelope glycoproteins via CD4 for antigen presentation. *J Immunol* 191, 60-69.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., and Haslett, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology today* 14, 131-136.
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195.
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., *et al.* (2013). IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* 38, 970-983.
- Schreuder, T.C., Gelderblom, H.C., Weegink, C.J., Hamann, D., Reesink, H.W., Devries, J.H., Hoekstra, J.B., and Jansen, P.L. (2008). High incidence of type 1 diabetes mellitus during or shortly after treatment with pegylated interferon alpha for chronic hepatitis C virus infection. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 28, 39-46.
- Schwab, N., Zozulya, A.L., Kieseier, B.C., Toyka, K.V., and Wiendl, H. (2010). An imbalance of two functionally and phenotypically different subsets of plasmacytoid dendritic cells characterizes the dysfunctional immune regulation in multiple sclerosis. *J Immunol* 184, 5368-5374.
- Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2012). Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 209, 653-660.
- Sen, P., Wallet, M.A., Yi, Z., Huang, Y., Henderson, M., Mathews, C.E., Earp, H.S., Matsushima, G., Baldwin, A.S., Jr., and Tisch, R.M. (2007). Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NF-kappaB activation in dendritic cells. *Blood* 109, 653-660.
- Shi, L., Kraut, R.P., Aebersold, R., and Greenberg, A.H. (1992). A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *The Journal of experimental medicine* 175, 553-566.
- Shimamoto, A., Chong, A.J., Yada, M., Shomura, S., Takayama, H., Fleisig, A.J., Agnew, M.L., Hampton, C.R., Rothnie, C.L., Spring, D.J., *et al.* (2006). Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 114, I270-274.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of experimental medicine* 189, 1777-1782.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.
- Sims, G.P., Rowe, D.C., Rietdijk, S.T., Herbst, R., and Coyle, A.J. (2010). HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annual review of immunology* 28, 367-388.
- Singh, N., Dummer, J.S., Kusne, S., Makowka, L., Starzl, T.E., and Ho, M. (1988). Impact of OKT3 Therapy on Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus Infections After Liver Transplantation. *Transplantation proceedings* 20, 661-663.
- Smith, K.G., Strasser, A., and Vaux, D.L. (1996). CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *The EMBO journal* 15, 5167-5176.
- Smyth, M.J., Kelly, J.M., Baxter, A.G., Korner, H., and Sedgwick, J.D. (1998). An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell-mediated tumor rejection in the peritoneum. *The Journal of experimental medicine* 188, 1611-1619.
- Soulier, A., Blois, S.M., Sivakumaran, S., Fallah-Arani, F., Henderson, S., Flutter, B., Rabbitt, E.H., Stewart, P.M., Lavery, G.G., Bennett, C., *et al.* (2013). Cell-intrinsic regulation of murine dendritic cell function and survival by prereceptor amplification of glucocorticoid. *Blood* 122, 3288-3297.

- Spielman, J., Lee, R.K., and Podack, E.R. (1998). Perforin/Fas-ligand double deficiency is associated with macrophage expansion and severe pancreatitis. *J Immunol* 161, 7063-7070.
- Steinfelder, S., Andersen, J.F., Cannons, J.L., Feng, C.G., Joshi, M., Dwyer, D., Caspar, P., Schwartzberg, P.L., Sher, A., and Jankovic, D. (2009). The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *The Journal of experimental medicine* 206, 1681-1690.
- Steinman, R.M. (2003). The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathologie-biologie* 51, 59-60.
- Steinman, R.M., Adams, J.C., and Cohn, Z.A. (1975). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *The Journal of experimental medicine* 141, 804-820.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* 137, 1142-1162.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., Liu, K., Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Iyoda, T., Ravetch, J., Dhodapkar, M., Inaba, K., and Nussenzweig, M. (2003). Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 987, 15-25.
- Stepp, S.E., Dufourcq-Lagelouse, R., Le Deist, F., Bhawan, S., Certain, S., Mathew, P.A., Henter, J.I., Bennett, M., Fischer, A., de Saint Basile, G., and Kumar, V. (1999). Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 286, 1957-1959.
- Stewart, T.A., Hultgren, B., Huang, X., Pitts-Meek, S., Hully, J., and MacLachlan, N.J. (1993). Induction of type I diabetes by interferon-alpha in transgenic mice. *Science* 260, 1942-1946.
- Stranges, P.B., Watson, J., Cooper, C.J., Choisy-Rossi, C.M., Stonebraker, A.C., Beighton, R.A., Hartig, H., Sundberg, J.P., Servick, S., Kaufmann, G., *et al.* (2007). Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity* 26, 629-641.
- Strasser, D., Neumann, K., Bergmann, H., Marakalala, M.J., Guler, R., Rojowska, A., Hopfner, K.P., Brombacher, F., Urlaub, H., Baier, G., *et al.* (2012). Syk kinase-coupled C-type lectin receptors engage protein kinase C-sigma to elicit Card9 adaptor-mediated innate immunity. *Immunity* 36, 32-42.
- Sutterwala, F.S., Noel, G.J., Clynes, R., and Mosser, D.M. (1997). Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *The Journal of experimental medicine* 185, 1977-1985.
- Sutton, V.R., Wowk, M.E., Cancilla, M., and Trapani, J.A. (2003). Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* 18, 319-329.
- Swann, J.B., Hayakawa, Y., Zerafa, N., Sheehan, K.C., Scott, B., Schreiber, R.D., Hertzog, P., and Smyth, M.J. (2007). Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. *J Immunol* 178, 7540-7549.
- Swiecki, M., Wang, Y., Gilfillan, S., Lenschow, D.J., and Colonna, M. (2012). Cutting edge: paradoxical roles of BST2/tetherin in promoting type I IFN response and viral infection. *J Immunol* 188, 2488-2492.
- Swiecki, M., Wang, Y., Vermi, W., Gilfillan, S., Schreiber, R.D., and Colonna, M. (2011). Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *The Journal of experimental medicine* 208, 2367-2374.
- Szabo, A., Magyarics, Z., Pazmandi, K., Gopcsa, L., Rajnavolgyi, E., and Bacsí, A. (2014). TLR ligands upregulate RIG-I expression in human plasmacytoid dendritic cells in a type I IFN-independent manner. *Immunology and cell biology* 92, 671-678.

T

- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlratt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International immunology* 13, 933-940.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L., and Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169, 10-14.

Tanaka, T., Kajiwar, T., Kutomi, G., Kurotaki, T., Saito, K., Kanaseki, T., Tsukahara, T., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Hirata, K., *et al.* (2015). CpG-A stimulates Hsp72 secretion from plasmacytoid dendritic cells, facilitating cross-presentation. *Immunology letters* 167, 34-40.

Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annual review of immunology* 23, 901-944.

Tel, J., Schreibeit, G., Sittig, S.P., Mathan, T.S., Buschow, S.I., Cruz, L.J., Lambeck, A.J., Figdor, C.G., and de Vries, I.J. (2013). Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8⁺ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood* 121, 459-467.

Terrell, C.E., and Jordan, M.B. (2013). Perforin deficiency impairs a critical immunoregulatory loop involving murine CD8⁺ T cells and dendritic cells. *Blood* 121, 5184-5191.

Thomas, C.J., and Schroder, K. (2013). Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends in immunology* 34, 317-328.

Thomas, J.O. (2001). HMGI and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochemical Society transactions* 29, 395-401.

Tian, J., Avalos, A.M., Mao, S.Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., *et al.* (2007). Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nature immunology* 8, 487-496.

Torchinsky, M.B., Garaude, J., Martin, A.P., and Blander, J.M. (2009). Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature* 458, 78-82.

Trinchieri, G., and Santoli, D. (1978). Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *The Journal of experimental medicine* 147, 1314-1333.

Trinchieri, G., and Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature reviews. Immunology* 7, 179-190.

U

Uematsu, S., Jang, M.H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., *et al.* (2006). Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c⁺ lamina propria cells. *Nature immunology* 7, 868-874.

Urbanaviciute, V., Furnrohr, B.G., Meister, S., Munoz, L., Heyder, P., De Marchis, F., Bianchi, M.E., Kirschning, C., Wagner, H., Manfredi, A.A., *et al.* (2008). Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *The Journal of experimental medicine* 205, 3007-3018.

V

van Liempt, E., van Vliet, S.J., Engering, A., Garcia Vallejo, J.J., Bank, C.M., Sanchez-Hernandez, M., van Kooyk, Y., and van Die, I. (2007). Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Molecular immunology* 44, 2605-2615.

Varol, C., Mildner, A., and Jung, S. (2015). Macrophages: development and tissue specialization. *Annual review of immunology* 33, 643-675.

Venereau, E., Casalgrandi, M., Schiraldi, M., Antoine, D.J., Cattaneo, A., De Marchis, F., Liu, J., Antonelli, A., Preti, A., Raeli, L., *et al.* (2012). Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *The Journal of experimental medicine* 209, 1519-1528.

Verbovetski, I., Bychkov, H., Trahtemberg, U., Shapira, I., Hareuveni, M., Ben-Tal, O., Kutikov, I., Gill, O., and Mevorach, D. (2002). Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *The Journal of experimental medicine* 196, 1553-1561.

Vignali, D.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology* 8, 523-532.

Villadangos, J.A., and Young, L. (2008). Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 29, 352-361.

Voll, R.E., Herrmann, M., Roth, E.A., Stach, C., Kalden, J.R., and Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390, 350-351.

Volpi, C., Fallarino, F., Bianchi, R., Orabona, C., De Luca, A., Vacca, C., Romani, L., Gran, B., Grohmann, U., Puccetti, P., and Belladonna, M.L. (2012). A GpC-rich oligonucleotide acts on plasmacytoid dendritic cells to promote immune suppression. *J Immunol* 189, 2283-2289.

Voskoboinik, I., Smyth, M.J., and Trapani, J.A. (2006). Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nature reviews. Immunology* 6, 940-952.

Voskoboinik, I., Whisstock, J.C., and Trapani, J.A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature reviews. Immunology*.

W

Walsh, K.P., and Mills, K.H. (2013). Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends in immunology* 34, 521-530.

Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F.K., Dale, J., Sneller, M., Yao, X., Puck, J.M., Straus, S.E., and Lenardo, M.J. (1999). Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98, 47-58.

Wang, Z., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Perone, M.J., Montecalvo, A., Zahorchak, A.F., Thomson, A.W., and Morelli, A.E. (2006). Use of the inhibitory effect of apoptotic cells on dendritic cells for graft survival via T-cell deletion and regulatory T cells. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6, 1297-1311.

Warger, T., Hilf, N., Rechtsteiner, G., Haselmayer, P., Carrick, D.M., Jonuleit, H., von Landenberg, P., Rammensee, H.G., Nicchitta, C.V., Radsak, M.P., and Schild, H. (2006). Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses. *The Journal of biological chemistry* 281, 22545-22553.

Warren, H.S., and Smyth, M.J. (1999). NK cells and apoptosis. *Immunology and cell biology* 77, 64-75.

Watanabe, N., Wang, Y.H., Lee, H.K., Ito, T., Cao, W., and Liu, Y.J. (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436, 1181-1185.

Weiss, H.A., Millward, J.M., and Owens, T. (2007). CD8⁺ T cells in inflammatory demyelinating disease. *Journal of neuroimmunology* 191, 79-85.

Wollenberg, A., Wagner, M., Gunther, S., Towarowski, A., Tuma, E., Moderer, M., Rothenfusser, S., Wetzel, S., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *The Journal of investigative dermatology* 119, 1096-1102.

X

Xia, C.Q., Chernatynskaya, A.V., Looney, B., Wan, S., and Clare-Salzler, M.J. (2014a). Anti-CD3 antibody treatment induces hypoglycemia and super tolerance to glucose challenge in mice through enhancing glucose consumption by activated lymphocytes. *Journal of immunology research* 2014, 326708.

Xia, C.Q., Peng, R., Chernatynskaya, A.V., Yuan, L., Carter, C., Valentine, J., Sobel, E., Atkinson, M.A., and Clare-Salzler, M.J. (2014b). Increased IFN- α -producing plasmacytoid dendritic cells (pDCs) in human Th1-mediated type 1 diabetes: pDCs augment Th1 responses through IFN- α production. *J Immunol* 193, 1024-1034.

Xia, C.Q., Peng, R., Qiu, Y., Annamalai, M., Gordon, D., and Clare-Salzler, M.J. (2007). Transfusion of apoptotic beta-cells induces immune tolerance to beta-cell antigens and prevents type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 56, 2116-2123.

Y

- Yan, H., Krishnan, K., Lim, J.T., Contillo, L.G., and Krolewski, J.J. (1996). Molecular characterization of an alpha interferon receptor 1 subunit (IFN α R1) domain required for TYK2 binding and signal transduction. *Molecular and cellular biology* *16*, 2074-2082.
- Yang, J., Huck, S.P., McHugh, R.S., Hermans, I.F., and Ronchese, F. (2006). Perforin-dependent elimination of dendritic cells regulates the expansion of antigen-specific CD8⁺ T cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 147-152.
- Yoshizaki, A., Komura, K., Iwata, Y., Ogawa, F., Hara, T., Muroi, E., Takenaka, M., Shimizu, K., Hasegawa, M., Fujimoto, M., and Sato, S. (2009). Clinical significance of serum HMGB-1 and sRAGE levels in systemic sclerosis: association with disease severity. *Journal of clinical immunology* *29*, 180-189.
- Youn, J.H., Oh, Y.J., Kim, E.S., Choi, J.E., and Shin, J.S. (2008). High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes. *J Immunol* *180*, 5067-5074.
- Young, L.J., Wilson, N.S., Schnorrer, P., Proietto, A., ten Broeke, T., Matsuki, Y., Mount, A.M., Belz, G.T., O'Keeffe, M., Ohmura-Hoshino, M., *et al.* (2008). Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nature immunology* *9*, 1244-1252.
- Yu, C.F., Peng, W.M., Oldenburg, J., Hoch, J., Bieber, T., Limmer, A., Hartmann, G., Barchet, W., Eis-Hubinger, A.M., and Novak, N. (2010). Human plasmacytoid dendritic cells support Th17 cell effector function in response to TLR7 ligation. *J Immunol* *184*, 1159-1167.
- Yuan, J. (1997). Transducing signals of life and death. *Current opinion in cell biology* *9*, 247-251.
- Yuasa, T., Kubo, S., Yoshino, T., Ujike, A., Matsumura, K., Ono, M., Ravetch, J.V., and Takai, T. (1999). Deletion of fcgamma receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis. *The Journal of experimental medicine* *189*, 187-194.

Z

- Zelenay, S., Keller, A.M., Whitney, P.G., Schraml, B.U., Deddouche, S., Rogers, N.C., Schulz, O., Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2012). The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *The Journal of clinical investigation* *122*, 1615-1627.
- Zhang, J., Raper, A., Sugita, N., Hingorani, R., Salio, M., Palmowski, M.J., Cerundolo, V., and Crocker, P.R. (2006). Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors. *Blood* *107*, 3600-3608.
- Zhou, A., Paranjape, J., Brown, T.L., Nie, H., Naik, S., Dong, B., Chang, A., Trapp, B., Fairchild, R., Colmenares, C., and Silverman, R.H. (1997). Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *The EMBO journal* *16*, 6355-6363.
- Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L'Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gasselin, I., Gordon, A., *et al.* (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nature medicine* *7*, 1339-1346.
- Zuckerman, S.H., and Evans, G.F. (1992). Endotoxin tolerance: in vivo regulation of tumor necrosis factor and interleukin-1 synthesis is at the transcriptional level. *Cellular immunology* *140*, 513-519.
- Zuniga, E.I., Liou, L.Y., Mack, L., Mendoza, M., and Oldstone, M.B. (2008). Persistent virus infection inhibits type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells to facilitate opportunistic infections. *Cell host & microbe* *4*, 374-386.

Régulation de la survie des cellules dendritiques plasmacytoïdes dans un contexte inflammatoire non viral

Résumé :

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont spécialisées dans la lutte antivirale, notamment grâce à leur capacité à sécréter des IFN de type I. Néanmoins, elles sont aussi impliquées dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative, et donc de la polarisation des lymphocytes T (LT). C'est pourquoi, lors d'un épisode inflammatoire intense, les pDC peuvent participer à l'initiation ou au maintien de syndromes inflammatoires et au développement de pathologies auto-immunes. Comme pour les cellules dendritiques conventionnelles, il doit donc exister un mécanisme de régulation permettant de contrôler l'activité des pDC. Dans un modèle expérimental inflammatoire non viral induit par l'injection de l'anticorps anti-CD3 (Ac α CD3), nous avons observé l'apoptose des pDC dans différents organes lymphoïdes dès 90 minutes après injection de l'Ac et ce, de façon dépendante de l'activation des LT. Nous avons pu observer que la faible survie des pDC dans ce contexte inflammatoire n'était pas associée à l'orage cytokinique induit par l'effet mitogénique de l'Ac α CD3. En revanche, nos résultats montrent que les LT CD8⁺ et la voie cytotoxique de la perforine sont responsables de la déplétion des pDC. Ce mécanisme de contrôle de la survie des pDC a aussi été retrouvé dans d'autres situations inflammatoires non virales comme lors de la maladie du greffon contre l'hôte. Ces données démontrent une nouvelle voie de rétrocontrôle de la réponse inflammatoire en ciblant la survie des pDC. Cette voie de régulation pourrait être ainsi utilisée à des fins thérapeutiques. En effet, contrôler la survie des pDC par l'activation des LT CD8⁺ et de la voie perforine dans des syndromes auto-immuns comme le lupus érythémateux disséminé, le psoriasis, la sclérose en plaques ou encore le diabète de type I, pourrait représenter une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement de ces maladies auto-immunes associées à une dérégulation des pDC.

Mots clés : cellules dendritiques plasmacytoïdes, anticorps anti-CD3, inflammation, LT CD8⁺, perforine

Abstract :

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are specialized in type I interferons (IFN-I) secretion to control viral infections. In addition, pDC can also participate to the initiation of the adaptive immune response and thus, polarize T cells. During acute inflammation or uncontrolled inflammatory episodes, pDC can favor and maintain the inflammatory syndromes and autoimmune disease development. Regulatory mechanisms exist to control dysregulated inflammatory response affecting conventional DC survival for instance. Therefore we addressed in this work whether regulatory mechanisms exist to control pDC activation during inflammatory episodes. Using an experimental mouse model of non-viral acute inflammation induced by the injection the CD3-specific antibody (α CD3 Ab), we could observed that pDC underwent apoptosis as soon as 90 minutes in different lymphoid organs. This weak survival of pDC after Ab injection was associated with T cell activation. Whereas pDC depletion was not associated with the CD3-induced cytokine storm, our data showed that CD8⁺ T cells and the perforin pathway were involved in the depletion of pDC during this acute inflammatory context. This mechanism was also observed in other non-viral inflammatory settings such as during acute graft-versus-host disease. Overall, these data demonstrate that CD8⁺ T cells and the perforin pathway play a major role in acute inflammatory response modulation through directly targeting pDC survival. In addition our data highlight this regulatory mechanism as a potent therapeutic option to control pDC survival, since they are involved in the physiopathology of autoimmune disorders such as systemic lupus erythematosus, psoriasis, multiple sclerosis or type I diabetes.

Keywords: plasmacytoid dendritic cells, CD3-specific antibody, inflammation, CD8⁺ T cells, perforin